

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/74753 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07C 69/94,  
65/105, C07D 333/28, A61K 31/235, 31/44, 31/381, A61P  
43/00, C07D 213/30, 307/54, 307/80, 213/55, 233/54,  
213/20, 215/14, 215/10, 217/24, 213/74, 231/16, 249/08,  
239/54, 239/26, 213/64, 261/10, 265/06, 311/16, 311/92,  
317/60, 277/32, 277/42, 333/24

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01264

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. März 2001 (30.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 15 525.1 30. März 2000 (30.03.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZEN-  
TRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS  
[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg  
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERHÄUSER,  
Clarissa [DE/DE]; Langgewann 28, 69121 Heidelberg  
(DE). EICHER, Theophil [DE/DE]; Am Botanischen  
Garten 1, 66123 Saarbrücken (DE). PICK, Rigobert  
[DE/DE]; Hauptstrasse 19, 66606 St. Wedel (DE).

(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler,  
Truderinger Str. 246, 81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.



WO 01/74753 A1

(54) Title: SYNTHETIC DERIVATIVES OF LUNULARIC ACID, MEDICAMENTS CONTAINING SAID COMPOUNDS,  
METHOD FOR PRODUCING THE LUNULARIC ACID DERIVATIVES AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: SYNTHETISCHE DERIVATE VON LUNULARSÄURE, ARZNEIMITTEL ENTHALTEND DIESE VER-  
BINDUNGEN, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DER LUNULARSÄUREDERIVATE SOWIE DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to lunularic acid derivatives which are suitable as chemopreventive agents.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Lunularsäurederivate, die sich als chemopräventive Agentien eignen.

**Synthetische Derivate von Lunularsäure, Arzneimittel  
enthaltend diese Verbindungen, Verfahren zur Herstellung der  
Lunularsäurederivate sowie deren Verwendung**

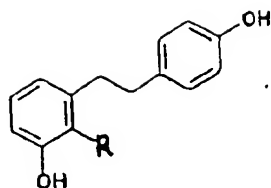
Die Erfindung betrifft synthetische Derivate von Lunularsäure, Arzneimittel enthaltend diese Verbindungen, Verfahren zur Herstellung der Lunularsäurederivate sowie deren Verwendung als chemopräventive Agentien gegen Krebserkrankungen.

Da Krebs eine Erkrankung ist, die heute aus verschiedensten Gründen (z.B. Älterwerden der Bevölkerung, negative Umwelteinflüsse usw.) schon ein Drittel der Bevölkerung von Industriestaaten betrifft und noch mit einer weiteren Zunahme der Erkrankungen zu rechnen ist, gibt es Bemühungen Stoffe herauszufinden, welche frühzeitig angewendet, einen Schutz vor dem Entstehen von Krebs geben (Krebsprophylaxe). Es gibt deshalb eine ausgedehnte Forschungsrichtung, die sich mit der Identifikation neuer chemopräventiver Agentien beschäftigt, um den dringenden Bedarf der Krebsverhütung zu decken.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Identifikation neuer chemopräventiver Agentien, die einfach und nebenwirkungsfrei anzuwenden sind.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

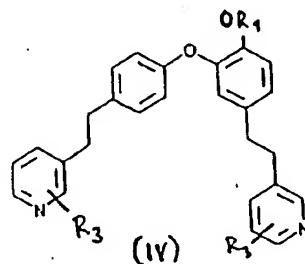
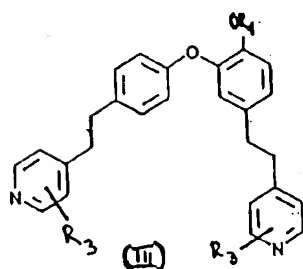
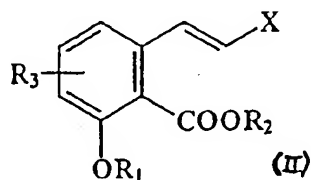
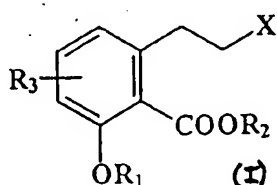
Von den Erfindern wurde bereits früher gefunden, daß Lunularsäure (2-Hydroxy-6-[2-(4-hydroxy-phenyl)]ethylbenzoesäure) und Lunularin, die aus Leberblümchen, welche zur Kategorie der Moose gehören, isoliert werden können, eine chemopräventive Wirkung haben.



Lunularsäure: R = COOH

Lunularin: R = H

Jetzt wurde weiter herausgefunden, daß bestimmte Derivate der Lunularsäure eine noch weit über Lunularsäure und Lunularin hinausgehende positive Wirkung haben und selbst in geringen Dosen noch gegen Stoffwechselprozesse schützen, die für eine Krebsentstehung verantwortlich gemacht werden können. Gegenstand der Erfindung sind daher Verbindungen der allgemeinen Formel (I), (II), (III) oder (IV)



worin X ein beliebiger mono- oder polycyclischer (Hetero)Arylrest, der ggf. substituiert ist, ist. Beispiele hierfür sind ein carbocyclischer, monocyclischer Rest,

beispielsweise die Phenylgruppe, ein heterocyclischer, monocyclischer Rest, beispielsweise die Gruppen Thienyl, Thiophenyl, Furyl, Furanyl, Pyranyl, Pyrrolyl, Imidazolyl, Pyrazolyl, Pyridyl, Pyridinyl, Pyrrolidinyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Pyrazolonyl, Pyridazinyl, Purinyl, Thiazolyl, Oxazolyl, Indolyl, Furazannyl, Pyrrolinyl, Imidazolinyl, Pyrazolinyl, Thiazolinyl, Triazolyl, Tetrazolyl, sowie die Positionsisomeren des oder der Heteroatome, die diese Gruppen umfassen können, ein Rest bestehend aus carbocyclischen kondensierten Ringen, beispielsweise die Naphthylgruppe oder die Phenanthrenylgruppe, ein Rest bestehend aus kondensierten heterocyclischen Ringen, beispielsweise Benzofuranyl, Benzothienyl, Benzimidazolyl, Benzothiazolyl, Naphtho[2,3-b]thienyl, Thianthrenyl, Isobenzofuranyl, Chromenyl, Xanthenyl, Phenoxathiinyl, Indolizinyl, Isoindolyl, 3H-Indolyl, Indolyl, Indazolyl, Purinyl, Chinolizinyl, Isochinolyl, Chinolyl, Phthalzinyll, Naphthyridinyl, Chinoxalinyll, Chinazolinyll, Chinolinyll, Pteridinyl, Carbazolyl,  $\beta$ -Carbolinyll, Cinnolinyll, Acridinyl, Phenazinyl, Phenothiazinyl, Phenoxazinyl, Indolinyll, Isoindolinyll, Imidazopyridyl, Imidazopyridimidinyl oder auch die kondensierten polycyclischen Systeme bestehend aus heterocyclischen Monozyklen, wie beispielsweise vorstehend definiert, wie beispielsweise Thionaphthenyl, Furo[2,3-b]pyrrol oder Thieno[2,3-b]furan, und insbesondere die Phenyl-, Furylgruppen, wie 2-Furyl, Imidazolyl, wie 2-Imidazolyl, Pyridyl, wie 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, Pyrimidinyl, wie Pyridimid-2-yl, Thiazolyl, wie Thiazol-2-yl, Thiazolinyl, wie Thiazolin-2-yl, Triazolyl, wie Triazolyl-2-yl, Tetrazolyl, wie Tetrazol-2-yl, Benzimidazolyl, wie Benzimidazol-2-yl, Benzothiazolyl, Benzothiazol-2-yl, Purinyl, wie Purin-7-yl, oder Chinolyl, wie 4-Chinolyl.

In den obigen Formeln können  $R_1$  und  $R_2$  jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, einen geraden oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen geraden oder verzweigten Alkenylrest mit 2 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polyzyklischen Alkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polyzyklischen Alkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen, oder einen mono- oder polyzyklischen

aromatischen Rest bedeuten, wobei diese Reste gegebenenfalls durch einen oder mehrere Substituenten substituiert sein können.  $R_1$  und  $R_2$  können gleich oder verschieden sein.

Es kann für  $R_1$  und/oder  $R_2$  jeder beliebige gerade oder verzweigte  $C_{1-30}$ -Alkylrest verwendet werden. Beispiele hierfür sind Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutyl-, tert.-Butyl-, n-Butyl-, n-Hexyl-, 2-Methylpentyl-, 2,3-Dimethylbutyl-, n-Heptyl-, 2-Methylhexyl-, 2,2-Dimethylpentyl-, 3,3-Dimethylpentyl-, 3-Ethylpentyl-, n-Octyl-, 2,2-Dimethylhexyl-, 3,3-Dimethylhexyl-, 3-Methyl-3-ethylpentylgruppen. Bevorzugt sind wegen der besseren Löslichkeit kurze Alkylketten, wie Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Isopropyl-. Bevorzugt sind  $R_1$  und  $R_2$  gerade  $C_{1-14}$ -Alkylreste oder  $C_{3-14}$ -Cycloalkylreste. Besonders bevorzugt stehen  $R_1$  und  $R_2$  für H,  $CH_3$  oder  $CH_3CH_2$ .

Es kann für  $R_1$  und/oder  $R_2$  jeder beliebige gerade oder verzweigte  $C_{2-30}$ -Alkenylrest verwendet werden. Beispiele hierfür sind Vinyl-, Propenyl-, Isopropenyl-, Allyl-, 2-Methylallyl-, Butenyl- oder Isobutenyl-, Hexenyl- oder Isohexenyl-, heptenyl- oder Isoheptenyl-, Octenyl- oder Isooctenylgruppen. Bevorzugt sind Vinyl-, Propenyl- und Isopropenyl-.

So kann  $R_1$  und/oder  $R_2$  jeder beliebige Cycloalkylrest sein. Beispiele hierfür sind eine Cyclopropyl-, Cyclobutyl-, Cyclopentyl- oder Cyclohexyl-, Cycloheptyl-, Cyclooctyl-, Cyclononyl- oder Cyclodecylgruppen. Bevorzugt sind Cyclopropyl-, Cyclobutyl-, Cyclopentyl- und Cyclohexyl-.

Der für  $R_1$  und/oder  $R_2$  verwendbare Cycloalkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen kann jeder beliebige Cycloalkenylrest sein. Beispiele hierfür sind eine Cyclobutenyl-, Cyclopentenyl- oder Cyclohexenyl-, Cycloheptenyl-, Cyclooctenyl-, Cyclononenyl- oder Cyclodecenylgruppen. Bevorzugt sind Cyclobutenyl-, Cyclopentenyl- oder Cyclohexenyl. Beispiele für polyzyklische Alkyl- bzw. Alkenylreste umfassen Norbornan, Adamantan oder Benzvalen.

Vorzugsweise vorhandene Substituenten der verschiedenen vorstehend angegebenen Reste X, R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> sowie des Grundgerüsts als Substituent R<sub>3</sub> können aus der folgenden Gruppe ausgewählt werden:

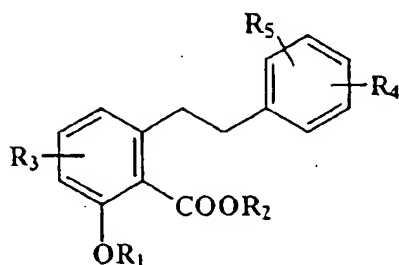
- Halogen: Fluor, Chlor, Brom, Iod,
- Amino, Alkylamino, Dimethylamino oder Ethylamino, Dialkylamino, wie Dimethylamino, Diethylamino, Methylethylamino, wobei jeder dieser Dialkylaminoreste gegebenenfalls in Oxidform vorliegt,
- Aminoalkyl, wie Aminomethyl oder Aminoethyl,
- Dialkylaminoalkyl, wie Dimethylaminomethyl oder -ethyl,
- Dialkylaminoalkyloxy, wie Dimethylaminoethyloxy,
- Hydroxyl,
- freie, veresterte Carboxylgruppe, wie Alkoxycarbonyl, beispielsweise Methoxycarbonyl oder Ethoxycarbonyl, oder in ein Salz, beispielsweise durch ein Natrium- oder Kaliumatom überführt,
- Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, tert.-Butyl, gegebenenfalls durch ein oder mehrere Halogenatom(e) substituiert, beispielsweise durch Fluor, wie Trifluormethyl,
- Oxo, Cyano, Nitro, Formyl,
- Acyl, wie Acetyl, Propionyl, Butyryl, Benzoyl,
- Acyloxy, wie Acetoxy oder ein Rest der Formel:  
 $-O-CO-(CH_2)_nCO_2H$ , worin  $n = 1$  bis 5,
- Alkoxy, wie Methoxy, Ethoxy, Propyloxy, Isopropyloxy, Butyloxy,
- Alkylthio, wie Methylthio, Ethylthio, Propylthio, Isopropylthio, Butylthio,
- Carbamoyl,
- Alkenyl, wie Vinyl, Propenyl,
- Alkinyl, wie Ethinyl, Propinyl und
- Aryl, wie Phenyl, Furyl, Thienyl.

Als Beispiele für derartige substituierte Reste können ein durch ein oder mehrere Halogenatom(e) substituierter Alkyl-

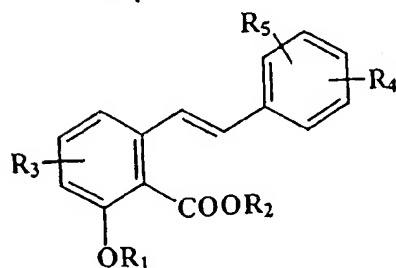
rest, wie die Trifluormethyl-, Trifluorbutyl-, Pentafluorpropyl-, Pentafluorbutyl-, Pentafluorpentyl-, Heptafluorbutyl- oder Nonafluorbutylgruppe oder 2-Chlorethyl- genannt werden.

Verbindungen der obigen Formeln (I), (II), (III) und (IV) werden im weiteren mit dem Begriff "Lunularsäurederivate" beschrieben.

Bevorzugte Verbindungen sind:



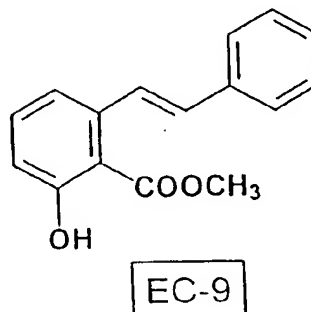
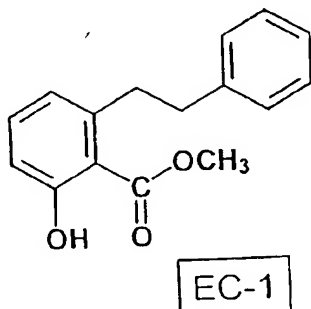
$R_1, R_2 = H, C_2H_5, CH_3$   
 $R_3 - R_5 = H, OH, OR, Br, Cl, AcO$   
 3,4-  
 3,5-  
 2,6

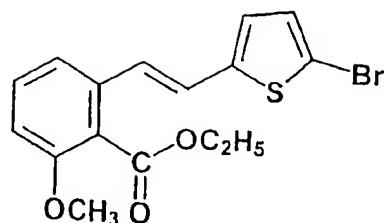


$R_1, R_2 = H, C_2H_5, CH_3$   
 $R_3 - R_5 = H, OH, OR, Br, Cl, AcO$   
 3,4-  
 3,5-  
 2,6

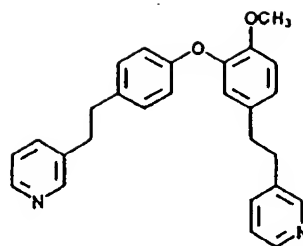
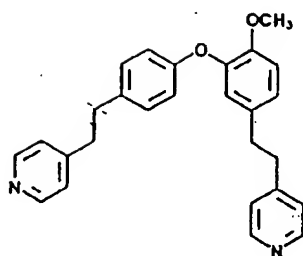
In den Tabellen 3 und 4 sind eine Reihe weiterer bevorzugter Verbindungen aufgelistet.

Erfindungsgemäß ganz bevorzugte Verbindungen sind:





EC-252



Vorzugsweise werden die Verbindungen der obigen Formeln (I) und (II) gemäß dem in Fig. 1 gezeigten Syntheschema hergestellt. Verbindungen der obigen Formeln (III) und (IV) sind analog den Vorschriften in Cullmann et al., Z. Naturforsch. 54c, S. 147-150 (1999) und Cullmann et al., Phytochemistry, Vol. 45, Nr. 6, S. 1235-1247 (1997) herstellbar.

Die vorstehend genannten erfindungsgemäßen Verbindungen eignen sich zur Prävention von Krebserkrankungen aller Art, indem sie einerseits bestimmte Stoffwechselprozesse hemmen, bei denen Stoffe entstehen, die die Krebsentstehung fördern, und andererseits bestimmte Stoffwechselprozesse fördern, die beispielsweise karzinogene Substanzen abfangen. Die Modulation von Enzymen, die bei der metabolischen Aktivierung und Freisetzung von Carcinogenen beteiligt sind, ist einer der am besten untersuchten Mechanismen für chemoprotektive Agentien. Phase 1-Enzyme (Cytochrome P450) aktivieren Xenobiotika durch das Einfügen von funktionellen Gruppen, die diese Verbindungen



besser wasserlöslich machen. Obwohl diese Funktionalisierung über Phase 1-Enzyme für die komplette Detoxifizierung von Substanzen notwendig ist, kann die Induktion von Phase 1-Enzymen das Risiko erhöhen, Carcinogene zu produzieren, die mit DNA reagieren können und Carcinogenese initiieren. Phase 2-Enzyme konjugieren die aktivierten Verbindungen an endogene Liganden, wie Glutathion oder Glucuron-, Essig- oder Schwefelsäure, wodurch die Freisetzung der Verbindungen in Form dieser Konjugate vermehrt wird. Allgemein stellt die Inhibierung von Phase 1-Enzymen gleichzeitig mit der Induktion von Phase 2 Enzymen eine logische Strategie bei der Chemoprävention dar, was besonders vorteilhaft in frühen Stadien der Carcinogenese ist. Um Modulatoren des Arzneimittel-Metabolismus zu identifizieren und damit eine Aussage über chemopräventive Agentien zu erhalten, werden beispielsweise die inhibitorischen Effekte auf die Phase 1 Cyp1A Aktivität und auf die Induktion der Phase 2 NAD(P)H:Chinonreduktase (QR) Aktivität bestimmt. Dazu werden beispielsweise  $\beta$ -Naphthoflavon-induzierte Rattenhepatomzellen als Quelle von Cyp1A verwendet. Die zeitabhängige Dealkylierung von 3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC) zu 3-Cyano-7-hydroxycumarin kann fluorometrisch in 96-Loch-Platten verfolgt werden (Crespi et al., Anal. Biochem. (1997), 248 (1): 188-190). Die Induktion von QR-Aktivität als Modell-Phase 2-Enzym wird beispielsweise colorimetrisch in kultivierten Hepa 1c1c7-Zellen gemessen. Dazu wird die NADPH-abhängige Menadiol-vermittelte Reduktion von MTT (3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in blaues Formazan untersucht (Prochaska et al., Anal. Biochem. 1988, 169(2): 328-336).

Stoffe mit chemopräventiven Eigenschaften zeichnen sich somit durch manigfaltige Wirkungsmechanismen aus: (1) gewünschter Fremdstoff-Metabolismus (z.B. gemessen als Induktion von NAD(P)H-Chinonreduktase und Hemmung von Cyp1A), (2) entzündungshemmende Mechanismen (z.B. gemessen als Hemmung der Induktion von iNOS und Hemmung von COX-1), (3) antioxidative Mechanismen verbunden mit Radikalfängereigenschaften (z.B. gemessen mittels Reaktion mit Diphenylpikrylradikalen) und (4)

anti-Tumor promovierende und anti-proliferative Eigenschaften (z.B. gemessen als Hemmung der Phorbol-ester-vermittelten Induktion der Ornithin-Decarboxylase oder gemessen anhand des Maus-Brustdrüsenmodells)

Die Verbindungen der obigen Formeln sind gut verträglich und können im Rahmen eines Arzneimittels zur Prävention von Krebserkrankungen verabreicht werden.

Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann auf verschiedenen Wegen verabreicht werden, z.B. oral, parenteral, kutan, subkutan, intravenös, intramuskulär oder rektal. Bevorzugt ist die nicht-invasive, d.h. orale, kutane oder rektale Verabreichung. Das Arzneimittel wird einem Patienten über einen vom Arzt zu bestimmenden Zeitraum oder wird stetig über lange Zeiträume verabreicht. Das Arzneimittel kann sowohl Menschen als auch Säugern verabreicht werden. Das Arzneimittel bietet sich auch an als Unterstützungsmedikation vor, während oder nach einer Tumorthherapie (Operation, Bestrahlung und/oder Chemotherapie) an.

Die Dosierung der erfindungsgemäßen Verbindung wird vom Arzt anhand der patientenspezifischen Parameter wie z.B. Alter, Gewicht, Geschlecht, Schwere der Erkrankung, etc. bestimmt.

Entsprechend der Art der Verabreichung wird das Arzneimittel in geeigneter Weise formuliert, z.B. in Form von einfachen oder dragierten Tabletten, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Pulver zur Rekonstitution vor Gebrauch, Granulaten, Suppositorien, Ovula, Injektionspräparaten, Infusionslösungen, Pomaden, Cremes, Gels, Mikrosphären, Implantaten, die nach üblichen galenischen Verfahren hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können gegebenenfalls zusammen mit weiteren Wirkstoffen und mit in pharmazeutischen Zusammensetzungen üblichen Exzipientien formuliert werden, z.B. je nach herzustellendem Präparat Talk, Gummi arabicum, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Kakaobutter, wäßrige und

nichtwässrige Träger, Fettkörper mit tierischem oder pflanzlichem Ursprung, Paraffinderivate, Glykole (insbesondere Polyethylenglykol), verschiedene Weichmacher, Dispergiermittel oder Emulgatoren, Konservierungsstoffe.

Zur Herstellung flüssiger Präparate können Additive wie Natriumchloridlösung, Ethanol, Sorbit, Glycerin, Olivenöl, Mandelöl, Propylenglycol oder Ethylenglycol verwendet werden.

Es können auch Infusions- oder Injektionslösungen hergestellt werden. Diese sind bevorzugt wässrige Lösungen oder Suspensionen, wobei es möglich ist, diese vor Gebrauch herzustellen, beispielsweise aus lyophilisierten Präparaten, die den Wirkstoff alleine oder zusammen mit einem Träger, wie Mannit, Lactose, Glucose, Albumin und dergleichen, enthalten. Die gebrauchsfertigen Lösungen werden sterilisiert und gegebenenfalls mit Hilfsmitteln vermischt, beispielsweise mit Konservierungsstoffen, Stabilisatoren, Emulgatoren, Lösungsvermittlern, Puffern und/oder Salzen zur Regulierung des osmotischen Drucks. Die Sterilisierung kann durch Sterilfiltration durch Filter mit einer kleinen Porengröße erzielt werden, wonach die Zusammensetzung gegebenenfalls lyophilisiert werden kann. Geringe Mengen an Antibiotika können auch zugesetzt werden, um die Beibehaltung der Sterilität zu unterstützen.

Vorteilhaft ist die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Arzneimittels in einer Dosis-Einheits-Form zur Verabreichung an einen Säuger.

Die Erfindung betrifft auch Arzneimittel bzw. pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Menge des aktiven Inhaltsstoffs (erfindungsgemäße Verbindung der obigen Formeln) zusammen mit organischen oder anorganischen inerten festen oder flüssigen pharmazeutisch verträglichen Trägern bzw. Verdünnungsmitteln, die für die beabsichtigte Verabreichung geeignet sind, und die mit den aktiven Inhaltsstoffen nicht nachteilig wechselwirken, enthalten.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Produktion einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß die erfindungsgemäße Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger vermischt wird.

Unter den erfindungsgemäßen Medikamenten können insbesondere die im experimentellen Teil beschriebenen Verbindungen und ganz besonders die Verbindungen, bei denen in der obigen Formel (I) oder (II) R1 und/oder R2, die gleich oder verschieden sein können, eine Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Isopropylgruppe ist, genannt werden.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel bzw. pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen als Wirkstoff mindestens einen wie vorstehend definierten Wirkstoff. Gegebenenfalls können noch weitere pharmazeutische Wirkstoffe in die Zusammensetzung aufgenommen werden, wie z.B.

- Antioxidantien [z.B. red. Gluthathion, N-Acetylcystein, natürliche Polyphenole wie Grüntee- (Epigallocate-chingallat und andere Catechine) oder Rotweinbestandteile (Resveratrol), Anthocyanidine, Flavonoide, Procyanidine],
- Vitamine [z.B. hochdosiertes Vitamin C, Vitamin E, Vitamin A, Vitamin D],
- Mineralstoffe [z.B. Magnesium, Zink, Calcium],
- Spurenelemente [z.B. Selen],
- Entzündungshemmer [z.B. Cyclooxygenase 1 oder 2 Hemmer (Nichtsteroidale Entzündungshemmer NSAIDs, wie ASS etc.), Lipoxxygenasehemmer oder Hemmstoffe der induzierbaren Stickstoffoxidsynthese],
- Hormonmodulatoren [z.B. Antiöstrogene (z.B. Tamoxifen, Genistein) oder Aromatasehemmer],
- Angiogenesehemmer [z.B. Genistein],
- Modulatoren der Signalübertragung [z.B. Proteinkinasehemmer (z.B. Curcumin oder Ras-Farnesylierungshemmer, wie Perillylalkohol oder Limonen)],
- Proliferationshemmer,
- Ornithin-Decarboxylase-Hemmer [z.B. DFMO]

- Apoptose-Induktoren
- Ballaststoffe (auch als Vorstufen von kurzkettigen Fettsäuren)
- Induktoren von Zellproliferationsprozessen [z.B. Natriumbutyrat]

Die Erfindung wird weiter anhand der Figur erläutert:

Fig. 1: Syntheschema

Fig. 2: Dosis-abhängige Inhibierung der präneoplastischen Läsionsbildung in einem MMOC-Modell durch EC-252

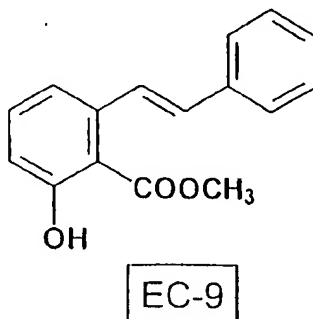
Die Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele näher erläutert.

#### Beispiel 1

#### Verfahren zur Herstellung von E-6-( $\omega$ -Styryl)salicylsäuremethylester (EC-9)

Zu einer Lösung von Natriummethanolat in Methanol (bereitet durch Auflösen von 9,20 g (400 mMol) Natrium in 300 ml wasserfreiem Methanol) gibt man 56,3 g (100 mMol) (3-Acetoxy-2-methoxycarbonyl)benzyl-triphenyl-phosphoniumbromid (Eicher et al., Synthesis 1988, S. 525) und rührt 30 Min. bei +20°C. Danach fügt man 10,6 g (100 mMol) Benzaldehyd (käufliches Produkt frisch destilliert) zu und erhitzt das Reaktionsgemisch 4 Std. unter Rückfluß. Danach kühlt man auf Raumtemperatur ab, neutralisiert durch Zugabe von Eisessig und entfernt das Solvens im Vakuum. Man nimmt den Rückstand in 300 ml Chloroform auf, wäscht zweimal mit je 100 ml Wasser, trocknet die organische Phase über  $MgSO_4$ , filtriert sie über 200 g Kieselgel (Nachelution mit wenig  $CHCl_3$ ) und entfernt das Solvens im Vakuum. Man erhält ein farbloses Öl, das in ca. 150

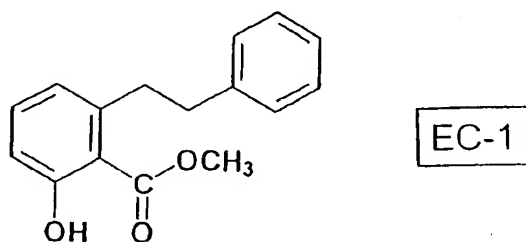
ml Petrolether (40-60°C) aufgenommen und bei -30°C (15 h) zur Kristallisation gebracht wird. Man erhält 23,6 g (93%) farblose Nadeln, E/Z-Gemisch, Smp. 51-52°C. Aus dem E/Z-Gemisch kann durch Erhitzen in Toluol (30 Std. unter Rückfluß) in Gegenwart von Iod (einige mg) das reine E-konfigurierte Produkt quantitativ erhalten werden (Smp.: 56-57°C).



## Beispiel 2

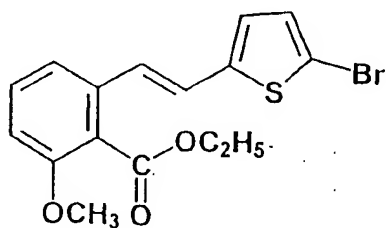
### Verfahren zur Herstellung von 6-(2-Phenylethyl)salicylsäuremethylester (EC-1)

22,0 g (86,3 mMol) des Produkts aus Beispiel 1 werden in 300 ml Essigester gelöst. Man fügt 2,0 g Palladium auf Aktivkohle (5%) als Katalysator zu und hydriert in einer konventionellen Hydrierapparatur (Fa. Parr) bei 5 bar Wasserstoff-Überdruck. Nach ca. 4 Std. ist die Wasserstoff-Aufnahme beendet. Man filtriert vom Katalysator ab, entfernt das Solvens im Vakuum, nimmt den Rückstand in Chloroform auf und filtriert die  $\text{CHCl}_3$ -Lösung über 300 g Kieselgel (Nachelution mit wenig  $\text{CHCl}_3$ ). Das Filtrat wird im Vakuum vom Solvens befreit und der Rückstand aus Petrolether (40-60°C) umkristallisiert. Man erhält 19,9 g (90%) des Produkts, farblose Prismen, Smp. 55-56°C.



**Beispiel 3****Verfahren zur Herstellung von E-1-(5-Bromthienyl)-2-[(2-ethoxycarbonyl-3-methoxy)phenyl]ethen (EC-252)**

Zu einer Lösung von Natriummethanolat in Methanol (bereitet durch Auflösen von 0,30 g (13,0 mMol) Natrium in 50 ml wasserfreiem Methanol) gibt man 5,63 g (10,0 mMol) (2-Ethoxycarbonyl-3-methoxy)benzyl-triphenyl-phosphoniumbromid (Eicher et al., Synthesis 1988, S. 525) und rührt 30 Min. bei +20°C. Danach fügt man 1,91g (10,0 mMol) 5-Bromthiophen-2-carbaldehyd (Fa. Acros Organics, Geel, Belgien) zu und rührt das Reaktionsgemisch 24 Std. bei +20°C. Das auskristallisierte Produkt wird abgesaugt und in 50 ml Chloroform gelöst. Die Lösung wird über 50 g Kieselgel filtriert (Nachelution mit wenig CHCl<sub>3</sub>). Das Solvens wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand [2,90 g (79%) E/Z-Gemisch] zweimal aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält 1,84 g (50%) des Produkts, gelbliche Nadeln, Smp. 93-94°C.



EC-252

**Beispiel 4****Bestimmung der chemopräventiven Aktivität ausgewählter Lunularsäurederivate**

Hepalclc7-Zellen (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) sät man in einer 96-Lochplatte in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml (200  $\mu$ l pro Loch) in  $\alpha$ -MEM enthaltend 100 Einheiten/ml Penicillin G-Na, 100 Einheiten/ml Streptomycinsulfat und 250 ng/ml Amphotericin B (Gibco BRL, Grand Island, NY) ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum aus und kultiviert bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Nach einer Präinkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium erneuert, die Testverbindungen gelöst in 10% DMSO (10  $\mu$ l, Endkonzentration 0,5%) zugegeben und die Platten für weitere 48 Stunden inkubiert. Die QR-Aktivität wurde durch Messen der NADPH-abhängigen Menadiol-vermittelten Reduktion von MTT (3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu blauem Formazan gemessen (Prochaska et al., Anal. Biochem. 1988, 169(2): 328-336). Die Proteine wurden durch Kristallviolett-Färbung eines identischen Satzes von Platten bestimmt. Die Induktion der QR-Aktivität wurde aus dem Verhältnis der spezifischen Enzymaktivitäten der mit den Verbindungen behandelten Zellen zu einer Lösungsmittelkontrolle berechnet. Die CD-Werte (benötigte Konzentration in  $\mu$ M, um die spezifische Enzymaktivität zu verdoppeln) wurden erzeugt. Die CD-Werte wurden mit den IC<sub>50</sub>-Werten (halbmaximale inhibitorische Konzentration der Zell-Lebensfähigkeit in  $\mu$ M) ins Verhältnis gesetzt, um den chemopräventiven Index CI zu erhalten. Zusätzliche Tests wurden in einer von Hepa 1clc7-Zellen abgeleiteten Mutanten-Zelllinie (BP<sup>f</sup>c1) unternommen, welche unfähig ist, den Ah Rezeptor-Ligandenkomplex in den Kern zu translocieren.

Für chemopräventiv wirkende Verbindungen ist eine Induktion von QR bei kleinen Konzentrationen wünschenswert.



Tabelle 1: Induktion von NAD(P)H : Chinonoxidoreduktase (QR) durch ausgewählte Bibenzyle (alle Daten in  $\mu\text{M}$ )

	Hepalcl7			BP <sup>c</sup> cl
	CD/CQ	IC50	CI	CD
A	51,4/n.d	> 93,5	> 1,8	n.I
B	20,4/n.d.	> 50	2,5	n.I
EC-1	0,22/6,8	31,3	171	n.I
EC-252	0,06/0,24	7,8	129	n.I
EC-9	0,03/0,16	7,2	223	n.I

CD/CQ = Konzentration, um die spezifische Aktivität von QR zu verdoppeln/zu vervierfachen

IC50 = halbmaximale inhibitorische Konzentration

CI = Chemopräventiver Index ; Verhältnis von IC50 und CD

n.d. = nicht bestimmt

n.I. = keine Induktion

A = Lunularin (Kontrolle)

B = Lunularsäure (Kontrolle)

Nachfolgend wurde die Dosis-abhängige Induktion von CyplA-Aktivität in kultivierten Hepalcl7 bestimmt. Die Hepalcl7-Zellen wurden analog wie oben beschrieben für 24 Stunden mit 0,5  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Naphthoflavon, einem klassischen bifunktionellen Induktor von Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen, behandelt. Zum Vergleich des induzierenden Potentials wurden die für die 10-fache Anhebung der CyplA-Aktivität erforderlichen Konzentrationen ermittelt. Da die Induktion von CyplA zu der Aktivierung von Procarcinogenen führen kann, wurde weiter das Potential, um CyplA-Aktivität zu inhibieren, getestet. Diese Untersuchungen wurden an Lysaten von  $\beta$ -Naphthoflavon-induzierten H4IIE Rattenhepatoma-Zellen und CEC

als Substrat gemacht. H4IIE-Zellen (ATCC American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) werden dazu in 10 cm Zellkulturplatten mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 ml MEME-Medium mit den gleichen Zusätzen, wie vorstehend für das  $\alpha$ -MEM-Medium angegeben, ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Danach wird das Medium erneuert und die Zellen für 38 Std. mit 10  $\mu$ M  $\beta$ -Naphthoflavon zur Induktion von Cyp1A induziert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, durch Abschaben in 1 ml 200 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Puffer 1) geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Aktivitätsbestimmung wird das Zellhomogenat bei Raumtemperatur aufgetaut, zur Lyse durch eine Kanüle Nr. 20 gedrückt und mit Puffer 1 auf 10 ml verdünnt. 90  $\mu$ l dieser Lösung (ca. 5-25  $\mu$ g Protein) werden in 96-Lochplatten zu einer Mischung aus 10  $\mu$ l der Testsubstanz in DMSO und 100  $\mu$ l Reaktionsgemisch (2-fach konzentriert) enthaltend 2,6 mM NADP, 6,6 mM Glucose-6-Phospaht, 10  $\mu$ M 3-Cyano-7-Ethoxycumarin (CEC) und 0,5 Einheiten Glucose-6-phosphatdehydrogenase gegeben. Der Ansatz wird kurz gemischt. Die Kinetik der zeitabhängigen Dealkylierung von CEC wird 45 Min. lang bei 37°C im Mikrotiterplattenfluorimeter mit einer Anregungswellenlänge von 409 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm aufgenommen (vgl. Crespi et al., Anal. Biochem. (1997), 248 (1), S. 188-190).

Die Induktion der Cyp1A-Aktivität ist als negativ zu bewerten, da diese Aktivität zu einer Aktivierung von Karzinogenen führen kann. Für chemopräventiv wirkende Verbindungen ist deshalb eine geringe Induktion von Cyp1A wünschenswert (am besten gar keine Cyp1A-Induktion) sowie eine Hemmung von Cyp1A bei kleinen Konzentrationen.

Tabelle 2: Modulation von CyplA-Aktivität durch ausgewählte Bibenzyle (alle Daten in  $\mu\text{M}$ )

	<u>CyplA-Induktion</u>	<u>CyplA-Inhibierung</u>
	$C_{10\text{-fach}}$	IC50
A	> 93,5	3,7
B	8,0	8,3
EC-1	2,1	0,99
EC-252	0,225	0,11
EC-9	< 0,13	0,08

$C_{10\text{-fach}}$  : Konzentration resultierend in einer 10-fachen Induktion der CyplA-Aktivität

IC50: Halbmaximale inhibitorische Konzentration

A : Lunularin (Kontrolle)

B : Lunularsäure (Kontrolle)

Desweiteren wurden alle Verbindungen der Tabelle 3 analog wie vorstehend beschrieben hinsichtlich der QR- und CyplA-Aktivität getestet. Die Auswertung ergab, daß einige der getesteten Verbindungen bessere Eigenschaften haben als andere. Verbindungen mit Werten, die diese als gute Chemopräventiva qualifizieren, sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Desweiteren wurden die Verbindungen der Tabelle 3 hinsichtlich der Hemmung der Lipopolysaccharid-induzierten Expression der iNOS in Maus-Makrophagen getestet ( $\text{NO}_2$ ). Die Inhibition der Lipopolysaccharid (LPS)-vermittelten iNOS-Induktion in Maus Raw 246.7-Makrophagen wurde mittels der Griess-Reaktion (Ding et al., J. Immunol. (1988), 141(7), S. 2407-2412) bestimmt. Dazu wurden Maus-Makrophagen in DMEM-Medium enthaltend 100 Einheiten/ml Penicillin G-Na, 100 Einheiten/ml Streptomycinsulfat und 250 ng/ml Amphotericin B ergänzt mit 10

% fötalem Kälberserum bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> -Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/Loch in DMEM in 96-Lochplatten kultiviert. Nach einer Präinkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium durch 170 µl serumfreies DMEM ersetzt. Die Testverbindungen (10 µl in 10% DMSO, 8 serielle 2-fach Verdünnungen, Endkonzentrationsbereich 0,8 bis 50 µM) wurden hinzugefügt. iNOS wurde durch Zusatz von 20 µl LPS-Lösung (500 ng/ml in serumfreiem DMEM) induziert. Nach 24 Stunden wurde die iNOS-Aktivität über die Quantifizierung der Nitritlevel in 100 µl Zellkulturüberständen gemäß der Griess-Reaktion bestimmt und mit einer Nitrit-Standardkurve verglichen. Um die zytotoxischen Effekte der Testverbindungen zu bestimmen, wurde das restliche Zellkulturmedium entfernt und die Zellen wurden bei 4°C für 30 Minuten mit 50 µl eiskalter 10%-iger wässriger Trichloressigsäure-Lösung fixiert, fünfmal mit Wasser gewaschen und kurz getrocknet. Die Zellzahlen wurden durch Sulforhodamin B-Färbung bestimmt (Skehan et al., J. Natl. Cancer Inst. (1990), 82(13), S. 1107-1112). Im allgemeinen wurden die Verbindungen in nicht-toxischen Konzentrationen getestet (Zellanfärbung > 50% der LPS-behandelten Kontrollzellen).

Für chemopräventiv wirkende Verbindungen ist eine Hemmung der Induktion der iNOS bei kleinen Konzentrationen wünschenswert. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Desweiteren wurden die Verbindungen der Tabelle 3 auf ihre antioxidativen Eigenschaften hin getestet. Dafür wurde das vermeintliche Potential der erfindungsgemäßen Verbindungen zum Abfangen von Diphenyl-picryl-hydrazyl-Radikalen (DPPH) ausgewählt. Dies erfolgte durch photometrisches Verfolgen der Reaktion mit 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) freien Radikalen in einem Mikroplatten-Format bei 515 nm (van Amsterdam et al., Free Radical Biol. Med. (1992), 12, S. 183-187). Dazu wurden die in DMSO gelösten Testverbindungen mit einer Lösung von 100 µM DPPH in Ethanol für 30 Minuten bei 37°C behandelt. Das Radikalfänger-Potential wurde mit einer Lösungsmittel-Kontrolle (0% Radikalfängereigenschaften) und

Ascorbinsäure (250  $\mu\text{M}$  Endkonzentration, 100% Radikalfängereigenschaften) verglichen. Die halbmaximale Radikalfängerkonzentration  $\text{SC}_{50}$  wurde generiert, die in einem Endkonzentrationsbereich von 2-250  $\mu\text{M}$  gewonnen wurden. Hier ist eine Hemmung von DPPH bei kleinen Konzentrationen der Testverbindungen erwünscht. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 4 gezeigt.

Ein weiterer Parameter, um die antioxidativen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen zu ermitteln, ist die Ermittlung der Hemmung des Phorbol-ester-vermittelten Superoxidbursts in differenzierten HL-60 Zellen. Die Inhibierung der Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)-induzierten Superoxid-Radikalbildung in menschlichen HL-60 promyelocytischen Leukämiezellen, die zu Granulocyten differenziert waren, wurde durch photometrische Bestimmung der Cytochrom c-Reduktion bestimmt (Takeuchi et al., Cancer Res. (1994), 54(22), S. 5837-5840, Pick und Mizel, J. Immunol. Meth. (1981), 46(2), S. 211-226). Dazu wurden HL-60 Zellen bei einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml mit 1,3% DMSO in RPMI 1640 Medium enthaltend 100 Einheiten/ml Penicillin G-Na und 100 Einheiten/ml Streptomycinsulfat ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum bei 37°C in einer 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre für vier Tage behandelt, um die terminale Differenzierung zu Granulocyten zu induzieren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit "Hanks balanced salt solution" enthaltend 30 mM HEPES, pH 7,8 gewaschen und auf eine Dichte von  $2 \times 10^6$  / ml eingestellt.  $2 \times 10^5$  Zellen/Loch (100  $\mu\text{l}$ ) werden mit den Testverbindungen (25  $\mu\text{l}$ , in 10% DMSO) für 5 Minuten vor der Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  Cytochrom c-Lösung in HHBSS (5 mg/ml, 1,25 mg/ml Endkonzentration) präinkubiert. 25  $\mu\text{l}$  Superoxid-Dismutase (600 U/ml in HHBS, 12 U/Loch Endkonzentration) wurden als Positivkontrolle verwendet, alle anderen Löcher erhielten 25  $\mu\text{l}$  HHBSS. Die Superoxidanion-Radikal-Bildung wurde durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  TPA (0,55 mg/ml in HHBSS, 55 ng/ml Endkonzentration) gestartet. Die Platten wurden leicht geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Kaltstellen der Platten auf Eis für

15 Minuten gestoppt. Danach wurden die Platten zentrifugiert und die Cytochrom c Reduktion im Überstand wurde bei 550 nm unter Verwendung eines Mikroplattenlesegerätes (Spectramax 340, Molecular Devices) bestimmt. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellwachstumsfähigkeit wurde fluorometrisch durch enzymatische Hydrolyse des fluorogenen Esterase-Substrats Calcein AM (250 nM in PBS, 100 µl/Loch) bei 37°C in einem Cytofluor 4000 Mikroplattenfluoreszenzlesegeräts (PE Applied Biosystems, Anregung 485 nm, Emission 620 nm) bestimmt. Unter Verwendung dieser Methode konnten unspezifische Effekte von reduzierenden Testverbindungen vermieden werden. Die Reaktion war linear für mindestens 30 Minuten.  $IC_{50}$  - Werte (halbmaximale inhibitorische Konzentration von TPA-induzierter Superoxid-Entstehung) wurden generiert. Hier ist eine Inhibierung der Entstehung von Superoxid-Radikalen bei kleinen Konzentrationen der Testverbindungen erwünscht. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 4 gezeigt.

Desweiteren wurden die Verbindungen der Tabelle 3 auf die TPA-induzierte ODC (Ornithin-Decarboxylase)-Aktivität in kultivierten Maus 308-Zellen untersucht. Die Kultivierung der Maus 308-Zellen, die Behandlung der Zellen mit den in seriellen Verdünnungen in DMSO (0,5% DMSO-Endkonzentration) zugefügten Testverbindungen und die Bestimmung der ODC-Aktivität wurde durchgeführt wie in Gerhäuser et al., Nat. Med. (1995), 1(3), S. 260-266 beschrieben. Der Proteingehalt der Zellysate unter Verwendung von Rinderserumalbumin as Standard wurde gemäß Bradford (Analyt. Biochem. (1976), 72(1-2), S. 248-254) gemessen und verwendet, um die ODC-spezifische Aktivität (pmol  $^{14}CO_2$ /mg Protein/Std.) zu berechnen.  $IC_{50}$  - Werte (halbmaximale inhibitorische Konzentration von TPA-induzierter ODC-Aktivität in µg/ml) wurden berechnet. Hier ist eine Inhibierung der Induktion von ODC bei kleinen Konzentrationen der Testverbindungen erwünscht. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 4 gezeigt.

Die Verbindungen der Tabelle 3 wurden auch auf eine

inhibitorische Wirkung auf die Cyclooxygenase (COX)-Aktivität getestet (Jang et al., Science (1997), 275, S. 218-220; Van der Ouderaa et al., Meth. Enzymol. (1982), 86, S. 60-68). Die COX-Aktivität wurde bei 37°C unter Aufzeichnen des Sauerstoff-Verbrauchs während der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine in einer 1,0 ml Inkubationszelle einer Sauerstoff-Elektroden-Einheit (Hansatech DW, basierend auf einer O<sub>2</sub> - Elektrode vom Clark-Typ) gemessen. Das Reaktionsgemisch enthaltend 0,1 M Natrium/Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 1 mM Hydrochinon, 0,01 mM Hemin und ungefähr 0,2 U COX-1 in 100 µl Mikrosomen-Fraktion erhalten aus Hammelsamenblasen als Ausgangsquelle für COX-1 (spezifische Aktivität 0,2 - 1 U/mg Protein) wurde mit 10 µl DMSO (Negativkontrolle) oder Testsubstanzlösung (10 mM in DMSO) für 90 Sek. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 50 mM Arachidonsäure in Ethanol (100 µM Endkonzentration) gestartet und der Sauerstoffverbrauch wurde für 20 Sek. aufgezeichnet. Für die Berechnung wurde die Rate des O<sub>2</sub> - Verbrauchs mit der DMSO-Kontrolle (100 % Aktivität) verglichen. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 4 gezeigt.

#### **Beispiel 5:**

#### **Nachweis der chemopräventiven Aktivität erfindungsgemäßer Verbindungen im Maus-Brustdrüsenmodell (MMOC)**

Mit diesem Modell können Testverbindungen daraufhin getestet werden, ob sie die Entstehung Carcinogen-induzierter präneoplastischer Läsionen in Maus-Brustdrüsen-Organkultur hemmen. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf eine chemopräventive Wirkung im Tiermodell.

Ein Nachteil von in-vitro Untersuchungen ist, daß die glatte Übertragbarkeit auf die in-vivo Situation oft nicht gegeben ist. Es wurde jedoch jetzt ein Organkulturmodell entwickelt,

das als Klammer zwischen Kurzzeit-in vitro-Versuchen und Langzeit-in vivo-Carcinogenesemodellen dienen kann. Dies ist das Maus-Brustdrüsenmodell (mouse mammary glands, MMOC; Mehta et al., Carcinogenesis 1995, 16(2), S. 399-404). Dieses System kombiniert die Vorteile eines in-vitro-Modells (Einfachheit, Handhabbarkeit, Dauer) mit den komplexen zellulären, metabolischen und Entwicklungsbedingungen in einem Organismus.

3 bis 4 Wochen alte jungfräuliche weibliche BALB/c Mäuse wurden durch tägliche subkutane Injektionen mit 1 µg Östradiol 17ß und 1 mg Progesteron für 9 Tage vorbereitet. Am Tag 10 werden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das thorikale Brustdrüsenpaar entnommen, das auf ein Seidengewebe gelegt wird. Diese Gewebepreparationen wurden 10 Tage in serumfreiem Waymouth MB752/I-Medium (5 Drüsen/5 ml Medium/Platte) inkubiert. Das Medium ist ergänzt mit 2 mM Glutamin, Antibiotika (Penicillin und Streptomycin, jeweils 100 Einheiten/ml Lösung) und wachstumsfördernden Hormonen, 5 µg Insulin, 5 µg Prolaktin, 1 µg Aldosteron und 1 µg Hydrocortison pro ml Medium. Das Carcinogen DMBA (2 µg/ml) wird dem Medium für 24 Stunden zwischen den Tagen 3 und 4 zugesetzt. Dieses Zeitintervall stellt den Zeitraum der DNA-Synthese dar. Kontrollplatten wurden mit DMSO (DMBA-Lösungsmittel) behandelt. Nach 10 Tagen Inkubation wurden die Drüsen für weitere 14 in einem Medium gehalten, das nur Insulin (5 µg/ml) enthielt. Während der gesamten Kulturdauer wurden die Drüsen bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre gehalten.

Die erfindungsgemäße Verbindungen EC-252 (Testagenz) wurde in verschiedenen Konzentration zu dem Medium für die Tage 0-10 gegeben (10-15 Drüsen pro Konzentration). Carcinogen-behandelte Drüsen ohne Testagenz dienten als Positivkontrolle. Am Ende des Experiments nach 24 Tagen wurden die Drüsen in 10% Formalin fixiert, mit Alauncarmin gefärbt und morphologisch das Vorhandensein von Drüsenläsionen untersucht. Das Auftreten (Inzidenz) von gebildeten Läsionen (Prozentsatz der Drüsen mit Läsionen bezüglich der Gesamtanzahl der Drüsen pro Gruppe) in der mit EC-252 behandelten Gruppe wird mit den Läsionen in der



nur mit DMBA-behandelten Gruppe (unbehandelte Gruppe = DMBA-Kontrolle) verglichen und daraus der Prozentsatz der Inhibierung berechnet. Das Ergebnis ist in Fig. 2 gezeigt.

Desweiteren wurden ausgewählte Verbindungen der Tabelle 3 analog wie vorstehend beschrieben im Maus-Brustdrüsenmodell getestet. Die Auswertung ergab, daß einige der getesteten Verbindungen bessere Eigenschaften haben als andere. Verbindungen mit Werten, die diese als gute Chemopräventiva qualifizieren, sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Weitere Ergebnisse der getesteten Verbindungen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

#### **Beispiel 6:**

##### **Nachweis der östrogenen bzw. antiöstrogenen Effekte der erfindungsgemäßen Verbindungen in der Ishikawa humanen Endometriumkrebs-Zelllinie**

Die Messung der Förderung von alkalischer Phosphatase (AP)-Aktivität in der Ishikawa humanen Endometrium-Adenocarcinoma-Zelllinie (Department of Biochemistry, University of Montreal) erlaubt die Abschätzung der instrinsischen östrogenen Aktivität der Testverbindungen gemäß Tabelle 3. Anti-östrogene Effekte wurden durch Co-Behandlung mit  $\beta$ -Östradiol und Inhibitoren bestimmt. Die Zellkulturbedingungen waren gemäß Littlefield et al., Endocrinology (1990), 127(6), S. 2757-2762.

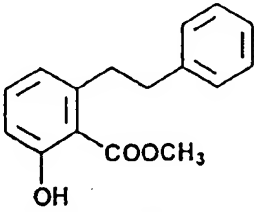
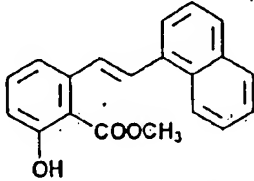
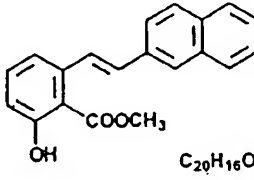
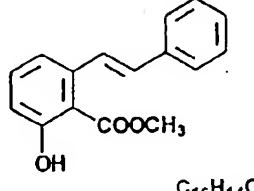
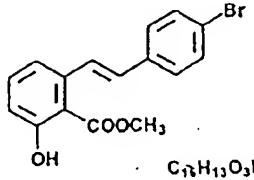
Die Ishikawa-Zellen wurden routinemäßig in  $\alpha$ -MEM Medium enthaltend 100 Einheiten/ml Penicillin G-Na, 100 Einheiten/ml Streptomycinsulfat und 250 ng/ml Amphotericin B ergänzt mit 10% Aktivkohle-gereinigtem fötalem Kälberserum bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub> - Atmosphäre gehalten. Einen Tag vor Start des

Experiments wurde das Medium in ein Östrogen- und Phenolrot-freies D-MEM/F-12-Gemisch (1:1) enthaltend L-Glutamat und Pyridoxin-HCl (Fa. Gibco BRL) ergänzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin G-Na, 100 Einheiten/ml Streptomycinsulfat und 250 ng/ml Amphotericin B und 5% Aktivkohle-gereinigtem fötalem Kälberserum gewechselt. Für die Bestimmung der östrogenen/anti-östrogenen Aktivität wurden die Zellen mit 0,25% Phenolrot-freiem Trypsin/EDTA trypsiniert und durch eine Injektionsnadel Nr. 18 gepreßt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Diese wurde in einer 96-Loch Mikroplatte in einer Dichte von  $2 \times 10^4$ /Loch in 200  $\mu$ l EFM plattiert. Nach einer Vorinkubationsphase von 24 Stunden wurde das Medium durch 170  $\mu$ l frisches EFM ersetzt. Die Testverbindungen gemäß Tabelle 3 (10  $\mu$ l in 10% DMSO, Endkonzentrationsbereich 0,8-50  $\mu$ M), 10  $\mu$ l 10% DMSO (als Negativkontrolle, Endkonzentration 0,5%) oder 10  $\mu$ l Tamoxifen (in 10% DMSO, Endkonzentration 0,5  $\mu$ M, als positives Antiöstrogen) und entweder 20  $\mu$ l EFM (für östrogene Aktivität) oder 20  $\mu$ l 50 nM  $\beta$ -Östradiol in EFM (für anti-östrogene Aktivität) wurden auf ein Endvolumen von 200  $\mu$ l zu den Platten hinzugefügt. Die Platten wurden bei 37°C in einer feuchten 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 72 Stunden inkubiert. Um die Wirkungen der Testverbindungen auf die Zellproliferation zu bestimmen, wurde die Zellwachstumsfähigkeit durch Calcein AM Hydrolyse fluorometrisch bestimmt. Dazu wurden die Platten dreimal mit PBS (vorgewärmt auf 37°C) gewaschen und 100  $\mu$ l 250 nM Calcein AM in vorgewärmtem PBS wurde zu jedem Loch hinzugefügt. Die Fluoreszenz wurde für 10 Minuten bei 37°C in einem Cytofluor 4000 Mikroplatten-Fluoreszenzlesegerät (PE Applied Biosystems, Anregung 485 nm, Emission 620 nm) gemessen. Die Calceinlösung wurde sofort entfernt und 50  $\mu$ l/Loch 0,5% Triton X in PBS wurde hinzugefügt. Die Platten wurden über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Um die AP-Aktivität zu bestimmen, wurden die Platten bei 37°C innerhalb von 2 Minuten aufgetaut und 100  $\mu$ l/Loch 15  $\mu$ M 4-Methyl-Umbelliferylphosphat (MUP) in 1 M Diethanolaminpuffer, pH 9,8 enthaltend 0,24 mM MgCl<sub>2</sub> wurden hinzugefügt. Die Platten wurden 5 Minuten auf einem Mikroplattenschüttler geschüttelt. Die Dephosphorylierung von MUP zu dem fluorescenten 4-Methyl-7-

hydroxy-coumarin (4-Methylumbelliferon) wurden für 45 Minuten bei 37°C (Anregung 360 nm, Emission 460 nm) beobachtet. Die AP-Aktivität und das Zellwachstum wurden aus den Raten der Produktbildung (in Fluoreszenzeinheiten/min) bestimmt. Das Verhältnis beider Raten wurde als ein Maß der relativen spezifischen AP-Aktivität berechnet. Die relative Vergrößerung der AP-Aktivität, die indikativ für eine östrogene Aktivität ist, wurde durch Vergleich mit einer DMSO-Lösungsmittelkontrolle berechnet. Für die Kalkulation der anti-östrogenen Wirkung wurden die Ergebnisse als Prozentsätze im Vergleich zu einer mit DMSO und  $\beta$ -Östradiol behandelten Kontrollprobe ausgedrückt. Tamoxifen wurden als Positivkontrollsubstanz verwendet und produzierte eine Inhibition von > 50% bei einer Testkonzentration von 0,5  $\mu$ M.

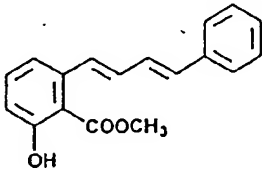
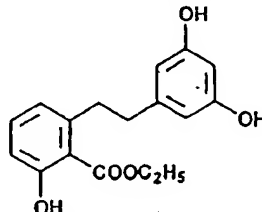
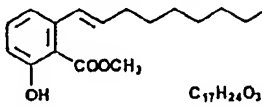
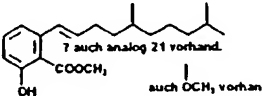
Testverbindungen mit Werten, die diese als gute Chemopräventiva qualifizieren, sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

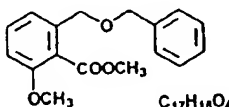
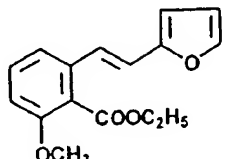
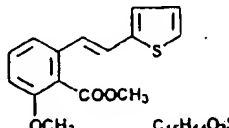
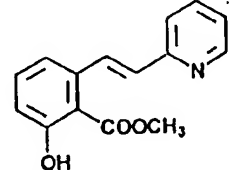
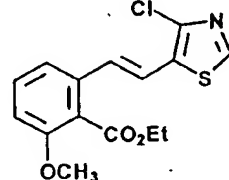
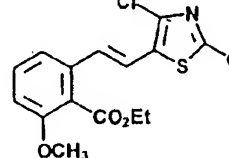
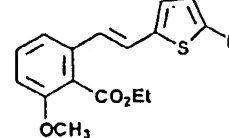
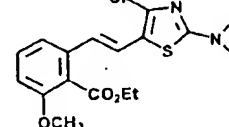
Tabelle 3

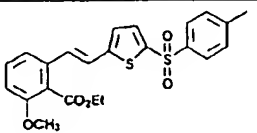
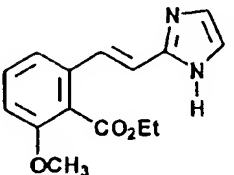
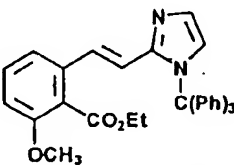
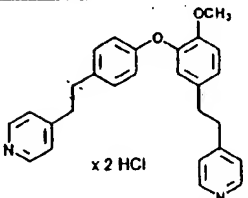
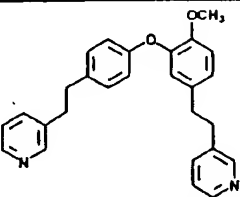
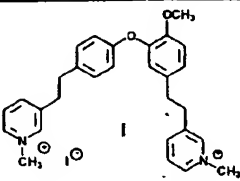
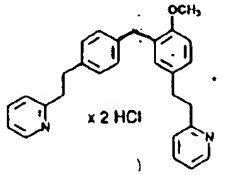
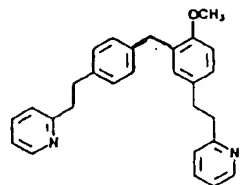
Name	Struktur	Molekulargewicht
Ei 1		256.30
Ei 2	 $C_{20}H_{16}O_3$	304.35
Ei 7	 $C_{20}H_{16}O_3$	304.35
Ei 9	 $C_{16}H_{14}O_3$	254.3
Ei 10	 $C_{17}H_{13}O_3Br$	333.2

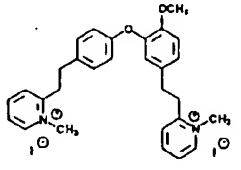
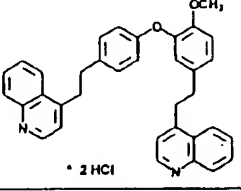
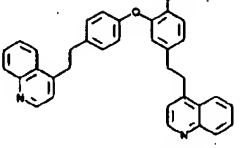
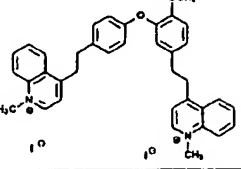
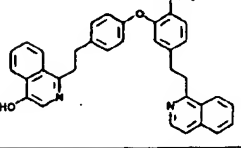
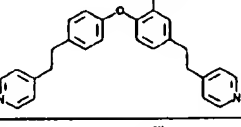
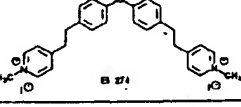
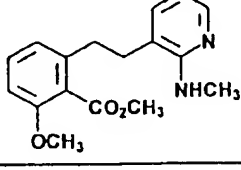
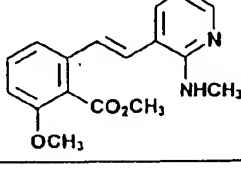
27a

Tabelle 3 (Forts.)

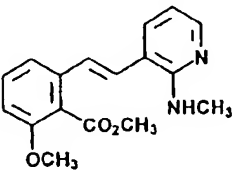
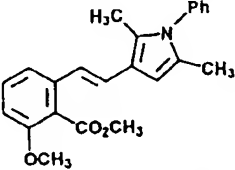
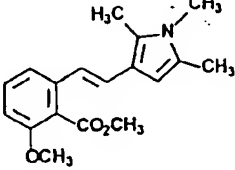
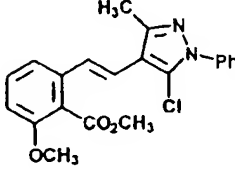
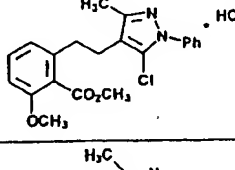
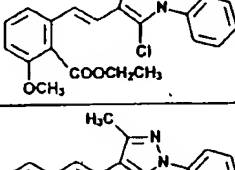
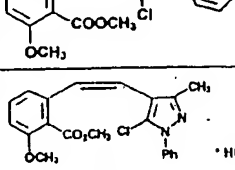
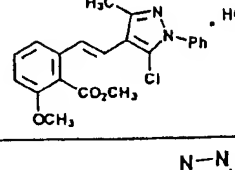
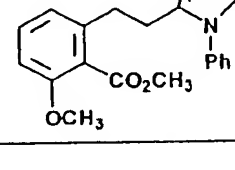

Ei 12		280
Ei 15		302
Ei 21	 <p style="text-align: right;"><math>C_{17}H_{24}O_3</math></p>	276.4
Ei 26	<p><math>C_{24}H_{32}O_3</math></p>  <p>7 auch analog 21 vorhanden. auch <math>OCH_3</math> vorhanden.</p>	318

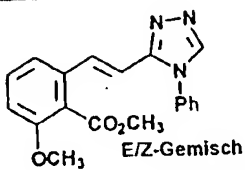
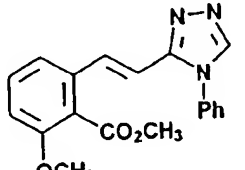
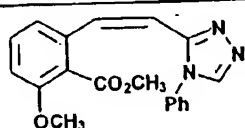
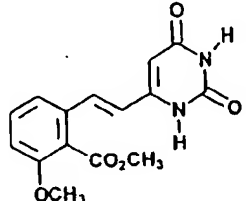
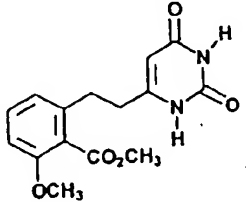
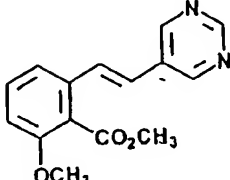
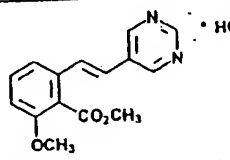
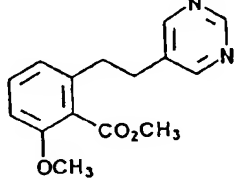
Ei 33	 <chem>COc1ccccc1COC(=O)Cc2ccccc2</chem> $C_{17}H_{18}O_4$	286.3
Ei 36B	 <chem>COc1ccccc1C(=O)OCCc2ccoc2</chem>	272.3
Ei 37	 <chem>COc1ccccc1C(=O)OCc2ccsc2</chem> $C_{15}H_{14}O_3S$	288.36
Ei 39	 <chem>COc1ccccc1C(=O)OCc2ccncc2</chem>	255
Ei 249	 <chem>COc1ccccc1C(=O)OCCc2cc(Cl)nn2s2</chem>	323.5
Ei 251	 <chem>COc1ccccc1C(=O)OCCc2cc(Cl)nn2s2Cl</chem>	358
Ei 252	 <chem>COc1ccccc1C(=O)OCCc2cc(Br)cs2</chem>	366.9
Ei 253	 <chem>COc1ccccc1C(=O)OCCc2cc(Cl)nn2s2N(CC)CC</chem>	394.5

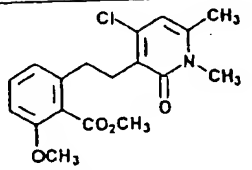
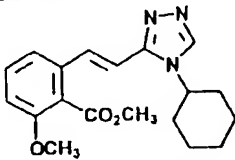
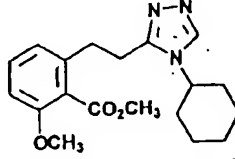
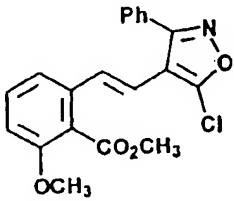
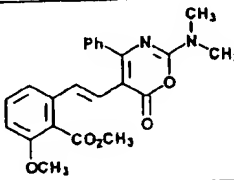
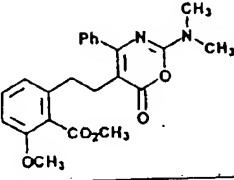
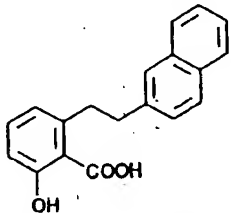
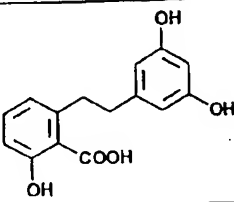
Ei 254		442
Ei 255		272
Ei 256		514
Ei 257		483
Ei 260		483
Ei 261		694
Ei 262		483
Ei 263		410

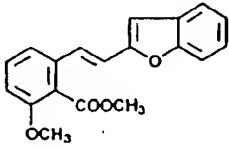
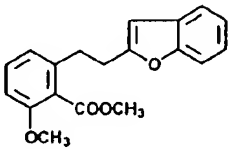
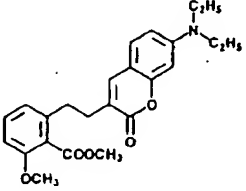
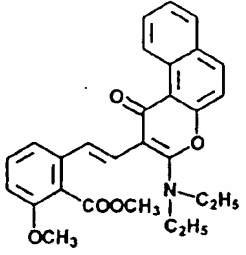
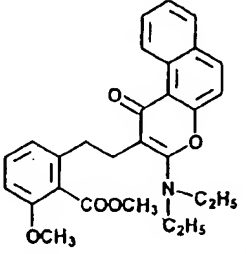
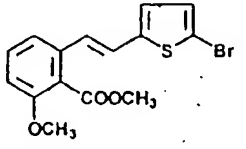
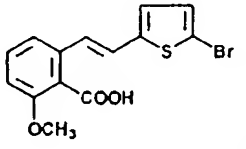
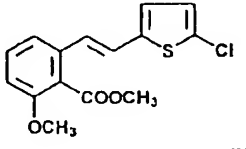
Ei 264		699.6
Ei 265	 * 2 HCl	583
Ei 266		510
Ei 267		793.8
Ei 268		542
Ei 273		483
Ei 274	 Ei 274	693.8
Ei 275		300
Ei 276		298



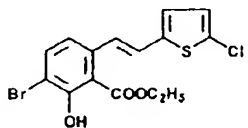
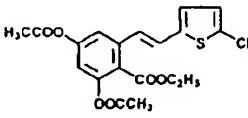
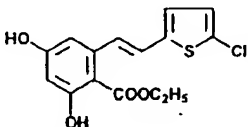
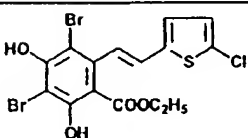
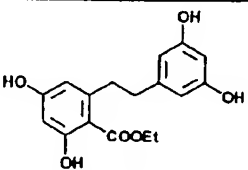
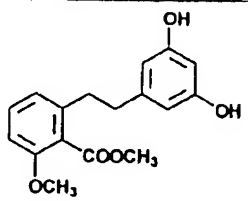
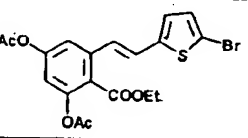
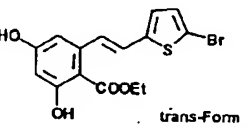
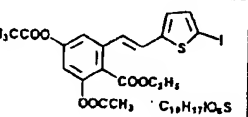
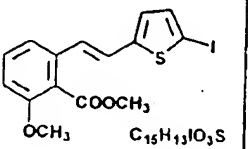
Ei 277		298
Ei 278		361
Ei 279 (Gemisch)		299/313
Ei 280		384
Ei 281		421
Ei 282		396.5
Ei 283		382.5
Ei 284		419
Ei 285		419
Ei 286		337

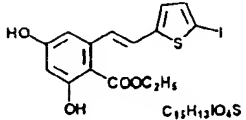
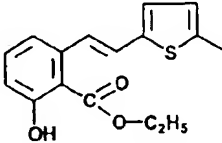
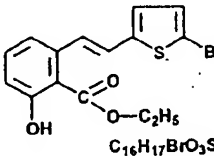
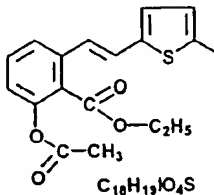
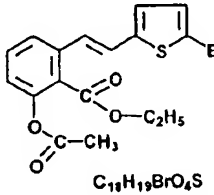
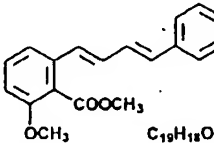
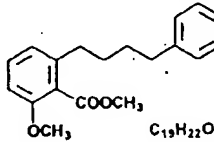
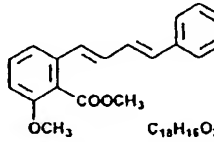
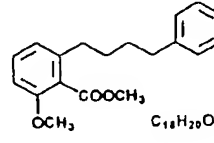
Ei 287	 E/Z-Gemisch	335
Ei 288		335
Ei 289		293
Ei 298		302
Ei 299		304
Ei 300		270
Ei 301	 • HC	306.5
Ei 302		272

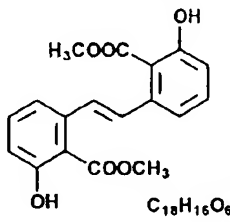
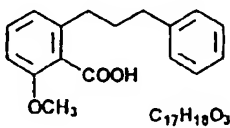
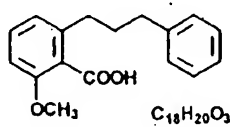
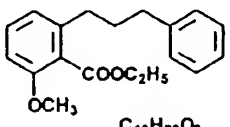
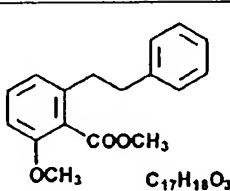
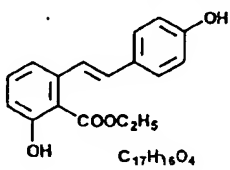
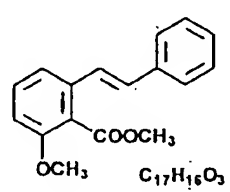
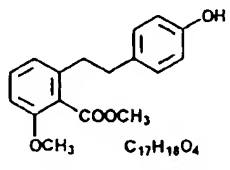
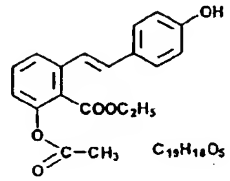
Ei 303		349.5
Ei 304		341
Ei 305		343
Ei 306		369.5
Ei 307		406
Ei 308		408
Ei 324		292
Ei 325		274

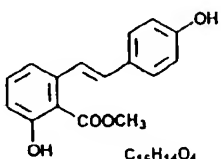
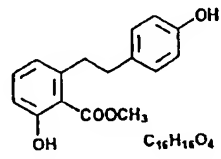
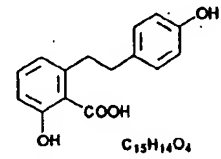
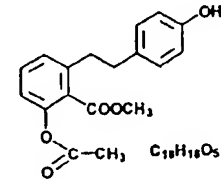
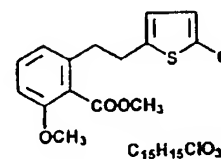
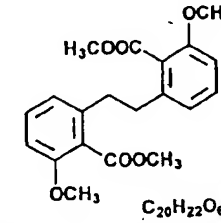
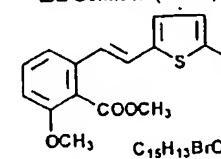
Ei 326		308
Ei 327		310
Ei 328		409.5
Ei 329		457.5
Ei 330		459.5
Ei 331		353.2
Ei 332		339.2
Ei 333		308.8

35

Ei 334		387.7
Ei 335		408.9
Ei 336		324.5
Ei 337		482
Ei 1001		318.3
Ei 1002		302.3
Ei 1003		453.3
Ei 1004		369.2
Ei 1005		500.30
Ei 1006		400.23

Ei 1007	 $C_{15}H_{13}IO_4S$	416.23
Ei 1008	 $C_{15}H_{13}IO_4S$	416.27
Ei 1009	 $C_{16}H_{17}BrO_3S$	369.27
Ei 1010	 $C_{18}H_{19}IO_4S$	458.31
Ei 1011	 $C_{18}H_{19}BrO_4S$	411.31
Ei 1012	 $C_{19}H_{18}O_3$	294.35
Ei 1013	 $C_{19}H_{22}O_3$	298.38
Ei 1014	 $C_{18}H_{16}O_3$	280.32
Ei 1015	 $C_{18}H_{20}O_3$	284.35

Ei 1016	 <chem>COC(=O)/C=C/c1cc(OC)c(O)cc1-c2cc(O)c(OC)cc2</chem> $C_{18}H_{16}O_6$	328.32	-
Ei 1017	 <chem>OC(=O)C1=CC=C(OC)C=C1CCC2=CC=CC=C2</chem> $C_{17}H_{18}O_3$	270.32	
Ei 1018	 <chem>OC(=O)C1=CC=C(OC)C=C1CCC2=CC=CC=C2</chem> $C_{18}H_{20}O_3$	284.35	
Ei 1019	 <chem>CCOC(=O)C1=CC=C(OC)C=C1CCC2=CC=CC=C2</chem> $C_{19}H_{22}O_3$	298.38	
Ei 1020	 <chem>COC(=O)C1=CC=C(OC)C=C1CCC2=CC=CC=C2</chem> $C_{17}H_{18}O_3$	270.32	
Ei 1021	 <chem>CCOC(=O)/C=C/c1cc(O)ccc1-c2cc(O)ccc2</chem> $C_{17}H_{16}O_4$	284.31	
Ei 1022	 <chem>COC(=O)/C=C/c1cc(OC)ccc1-c2ccccc2</chem> $C_{17}H_{16}O_3$	268.31	
Ei 1023	 <chem>COC(=O)C1=CC=C(OC)C=C1CCC2=CC(O)=CC=C2</chem> $C_{17}H_{18}O_4$	286.32	
Ei 1024	 <chem>CCOC(=O)/C=C/c1cc(O)c(OC(=O)C)cc1-c2cc(O)ccc2</chem> $C_{19}H_{18}O_5$	326.34	

Ei 1025	 <chem>COC(=O)/C=C/c1ccc(O)cc1</chem> $C_{16}H_{14}O_4$	270.28
Ei 1026	 <chem>COC(=O)CCc1ccc(O)cc1</chem> $C_{16}H_{16}O_4$	272.30
Ei 1027	 <chem>OC(=O)CCc1ccc(O)cc1</chem> $C_{15}H_{14}O_4$	258.27
Ei 1028	 <chem>COC(=O)CC(c1ccc(O)cc1)C(=O)OC</chem> $C_{18}H_{18}O_5$	314.33
Ei 1029	 <chem>COC(=O)CC(c1ccc(SCC1)cc1)COC</chem> $C_{15}H_{15}ClO_3S$	310.79
Ei 1030	 <chem>COC(=O)CC(c1ccc(OC)c(C(=O)OC)c1)COC</chem> $C_{20}H_{22}O_6$	358.39
Ei 1031	<p>E/Z Gemisch (ca.2:3)</p>  <chem>COC(=O)CC(c1ccc(SCC1)cc1)COC</chem> $C_{15}H_{13}BrO_3S$	353.23



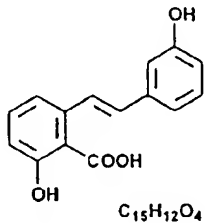
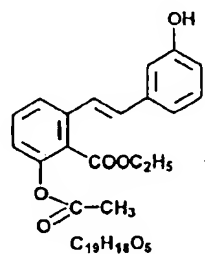
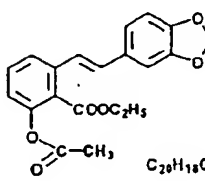
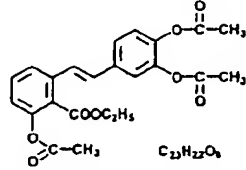
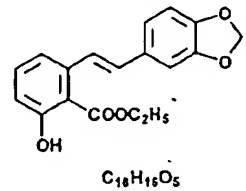
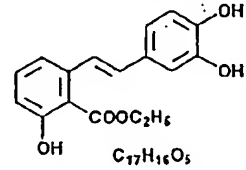
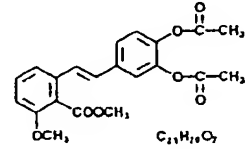
Ei 1032	 $C_{15}H_{12}O_4$	256.25
Ei 1033	 $C_{19}H_{18}O_5$	326.34
Ei 1034	 $C_{20}H_{18}O_6$	354.4
Ei 1035	 $C_{23}H_{22}O_8$	426.42
Ei 1036	 $C_{18}H_{16}O_5$	312.32
Ei 1037	 $C_{17}H_{16}O_5$	300.31
Ei 1038	 $C_{21}H_{20}O_7$	384.38

Tabelle 4

Namen	QR		CYP 1A1	Cyp. Ind.			NO2	DPPH	Antiox.
	CDVCO (µM)	IC50 (µM)	CI	IC50 (µM)	Ira. Ind. Ind.	IC50 Ind.	IC50 Hem. (µM)	IC50 Test (µM)	% Hem.
EC-1 = Ei-1	0.22/6.8	MW: 31.25	171	<1.22	<0.04	41,000	>50	>50	>390.6
EC-9 = Ei-9	<0.4/0.74	>50	>125	0.087	<0.04	>5	>50	>50	>250
Ei-15	n.l.	42.90	n.d.	0.500	25.30	>50			
Ei-37	1.75/7.8	44.50	25	0.727	1.34	>5	34.3	>50	>250
EC-252 = Ei-252	0.06/0.24	7.75 (st7)	129	0.082	<0.4	>5	>50	>50	>250
Ei-260 (x2HCl)	6.30	5.55	n.d.	0.058	n.l.	>5	1.9	22.90	>250
Ei-300	n.l.	>50	n.d.	0.934	9.10	>50	>50	>50	>250
Ei-302	n.l.	>50	n.d.	>5	34.90	>50	>50	>50	>250
Ei-325	n.l.	>50	n.d.	>5	36.70	>50	>50	>50	>250
Ei-331	<0.4/<0.4	11.00	28	0.292	<0.4	>50	>50	>50	>250

Tabelle 4 (Forts. quer)

Namen	Antiox.	ODC	COX-1			MMOC		ISHIKAW		
	IC <sub>50</sub> [µM]	IC <sub>50</sub> [µM]	% Hem.	IC <sub>50</sub> [µM] H-2O		Conc.	% Inh.	± IC <sub>50</sub>	± CD	max IC <sub>50</sub>
EC-1 = Ei-1	4,8		2							
EC-9 = Ei-9	>100		31			1	40	5,5	n.l.	>50
Ei-15	>100		94	8	1	1	0			
Ei-37	>100		32							
EC-252 = Ei-252	>100	>10	18			DR	0-60	2,8	n.l.	>50
Ei-260 (x2HC1)	15,4	3,4	10							
Ei-300	>100	>10	5							
Ei-302	>100	>10	2							
Ei-325	>100	>10	87	34	4					
Ei-331	>100	>10	13							

Tabelle 4 (Forts. quer)

Namen	QR		CYP 1A1		Cyp Ind.		NO2		DPPH	Antiox.	Antiox.
	CD/CO [µM]	IC50 [µM]	CI	IC50 [µM]	free hold ind.	IC50 [µM]	IC50 Hom. [µM]	IC50 Tox [µM]	IC50 [µM]	% Hom.	IC50 [µM]
Ei-1001	14,10	19,00	1	1.100	11,80	>50	13,7	48,90	>250		>100
Ei-1004	0,08/0,93	15,20	190	0,300	<0,4	>50	>50	>50	>250		>100
Ei-1009	0,043/0,229	0,43	10	0,050	<<0,04	1,530	>29,7	29,70	>250	0%	>100
Ei-1021	6,20	25,70	4	0,003	0,48	>5	37,4	>50	202,00		26,80
Ei-1022	<0,4	29,10	73	0,059	0,13	>5	>50	>50	>250	0%	>100
Ei-1024	0,6/6,2	44,70	75	0,005	<<0,04	>5	>50	>50	>250		22,60
Ei-1026	45,00	47,80	1	0,390	n.l.	>50	>50	>50	>250	71%	65,4
Ei-1027	n.l.	>50	n.d.	>5	n.l.	>50	>50	>50	>250	6%	>100
Ei-1034	<0,4	>50	125	0,005	<<0,04	>5	>50	>50	>250	51%	30,4
Ei-1035	n.l.	7,30	n.d.	0,023	n.l.	>5	24,9	34,10	>250	26%	>100
Ei-1037	n.l.	8,20	n.d.	0,057	n.l.	>5	15,5	>50	>250	0%	>100

Tabelle 4 (Forts. quer)

Namen	ODC	COX-1			MMOC		ISHIKAW		
	IC50 [µM]	% Hem.	IC50 [µM] ± SD		Conc.	% Inh.	+E IC50	-E IC50	Max IC50
Ei-1001	7,6	C1: 96	4	1	1	0			
Ei-1004	>10	C1: 64	39	3	1	50			
Ei-1009	>10	35							
Ei-1021	4,7	C1: 98	7	0	1	17			
Ei-1022	1,6	26							
Ei-1024	6,4	68	18	1					
Ei-1026	4,0	39							
Ei-1027	>10	9							
Ei-1034	>10	14					8,6	n.l.	>50
Ei-1035	>10	7					5	n.l.	26,4
Ei-1037	>10	44					8,7	n.l.	38,8

Zur Tabelle 4 (Alle Angaben in  $\mu\text{M}$  bzw. %):

#### FREMDSTOFF-METABOLISMUS

Gewünscht:

Induktion von QR bei kleinen Konzentrationen,  
Hemmung von Cyp1A bei kleinen Konzentrationen,  
keine Induktion von Cyp1A.

QR steht für Induktion der NAD(P)H:Chinon Reduktase in Hepelc1c7 Maus Hepatomzellen

CD = Konzentration die eine Verdopplung der spezifischen Aktivität der QR bewirkt.

IC<sub>50</sub> = halbmaximale Hemmkonzentration der Zellviabilität

CI = chemopräventiver Index (IC<sub>50</sub>/CD)

n.I. no Induction: Keine Induktion

n.d. not determined: nicht bestimmt

st.: Hinweis auf Cytostatische Wirkung?

Cyp1A = Hemmung der Cyp1A Enzymaktivität unter Verwendung von 3-Cyano-7-ethoxycoumarin.

Als Enzymquelle wurden  $\beta$ -Naphthoflavon induzierte H4IIE Ratten Hepatomzellen verwendet.

IC<sub>50</sub> = halbmaximale Hemmkonzentration

Cyp1A Ind. = Induktion der Cyp1A Enzymaktivität in Hepelc1c7 Maus Hepatomzellen

*Dieser Effekt ist negativ zu bewerten, kann zu einer Aktivierung von Karzinogenen führen! Wird aus mechanistischen Gründen mitbestimmt.*

Fünffache Induktion = Konzentration die eine Verfünffachung der spezifischen Aktivität von Cyp1A bewirkt.

IC<sub>50</sub> = halbmaximale Hemmkonzentration der Zellviabilität

#### ENTZÜNDUNGSCHEMMENDE MECHANISMEN

Gewünscht:

Hemmung der Induktion der iNOS bei kleinen Konzentrationen,  
Hemmung von Cox-1 bei kleinen Konzentrationen

NO<sub>2</sub>: Hemmung der LPS-induzierten Expression der iNOS in Maus Makrophagen

IC<sub>50</sub> Hem. = halbmaximale Hemmung der Nitrit (NO) Produktion

IC<sub>50</sub> Tox. = Halbmaximale Hemmung des Zellwachstums

CI s.o.

n.d. not determined: nicht bestimmt

Cox-1: Hemmung der Cyclooxygenase 1 Aktivität

% Hemm.: Prozentuale Hemmung bei einer Testkonzentration von 100 $\mu\text{M}$

IC<sub>50</sub> = halbmaximale Hemmkonzentration

#### ANTI-OXIDATIVE MECHANISMEN UND RADIKALFÄNGEREIGENSCHAFTEN

Gewünscht:

Hemmung bei kleinen Konzentrationen

DPPH: Reaktion mit Diphenylpicrylradikalen

IC<sub>50</sub> = halbmaximale Hemmkonzentration

**NXO:** Abfangen von Superoxidradikal Anionen im Xanthin/Xanthinoxidase System.

**IC<sub>50</sub>** = halbmaximale Hemmkonzentration

**Antiox:** Hemmung des Phorbol-ester-vermittelten Superoxidbursts in differenzierten HL-60 Zellen  
Nachweis über Reduktion von Cytochrom c.

**% Hemm.:** Prozentuale Hemmung bei einer Testkonzentration von 100 µM

**IC<sub>50</sub>** = halbmaximale Hemmkonzentration

#### ANTI-TUMOR PROMOVIERENDE UND ANTI-PROLIFERATIVE EIGENSCHAFTEN:

**Gewünscht:**

**Hemmung der Induktion von ODC bei kleinen Konzentrationen,**

**Hemmung der DNA Polymerase  $\alpha$  bei kleinen Konzentrationen,**

**anti-östrogene Eigenschaften bei kleinen Konzentrationen,**

**keine östrogenen Eigenschaften,**

**Hemmung der Entstehung von Läsionen im MMOC bei kleinen Konzentrationen**

**ODC:** Hemmung der Phorbol-ester-vermittelten Induktion der Ornithin Decarboxylase in Maus Keratinozyten (Zelllinie Nr. 308)

**IC<sub>50</sub>** = halbmaximale Hemmkonzentration

**$\alpha$ -Poly:** Hemmung der humanen DNA Polymerase  $\alpha$

**% Hemm.:** Prozentuale Hemmung bei einer Testkonzentration von 500 bzw. 100 µM

**IC<sub>50</sub>** = halbmaximale Hemmkonzentration

**Ishikawa:** östrogene (-E) bzw. antiöstrogene (+E) Effekte in der Ishikawa humanen Endometriumkrebs Zelllinie

(+E) **IC<sub>50</sub>** = halbmaximale Hemmkonzentration für anti-östrogene Effekte

(-E) **C<sub>s</sub>** = Konzentration die eine Verfünffachung der spezifischen Aktivität der alkalischen Phosphatase bewirkt (Maß für östrogene Aktivität)

**tox IC<sub>50</sub>:** Halbmaximale Hemmung des Zellwachstums

**n.I. no Induction:** keine Induktion

Nur für eine Auswahl bestimmt (siehe Tabelle Auswahl)

**MMOC:** Maus mammary organ culture

Hemmung der Entstehung Carcinogen-induzierter prä-neoplastischer Läsionen in Maus Brustdrüsen Organkultur

*Wichtiger Hinweis auf chemopräventive Wirkung im Tiermodell,*

**Konz.:** Testkonzentration in µM

**% Inh.:** Prozentuale Hemmung im Vergleich zur DMBA-Kontrolle

TABELLE 5

**Inhibierung von DMBA-induzierten präneoplastischen Läsionen in Maus-Brustdrüsen-  
Organkultur**

Behandlungsgruppe	Konzentration ( $\mu$ M)	%-Inzidenz	Inhibierung (normalisiert auf die DMBA-Kontrolle)
DMBA Ei-9	Keine 1	81 (13/16) 50/4/8	n.d. 40
DMBA Ei-15	Keine 1 10	72 (13/18) 80 (8/10) 55 (6/11)	n.d. 0 25
DMBA Ei-252	Keine 10 1 0.1 0.01 0.001	71 (12/17) 20 (2/10) 30 (3/10) 44 (4/9) 55 (6/11) 100 (9/9)	n.d. 72 58 38 23 0
DMBA	Keine 1 10	71 (12/17) 58 (7/12) 20 (2/10)	n.d. 17 72
DMBA EI-1001 EI-1004	Keine 1 1	66 (12/18) 88 (8/9) 33 (3/9)	n.d. 0 50

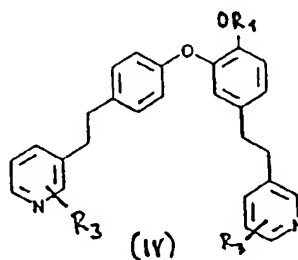
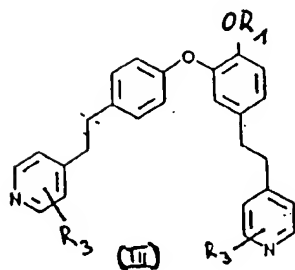
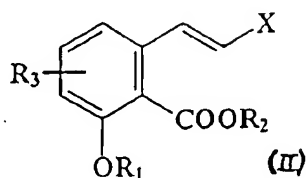
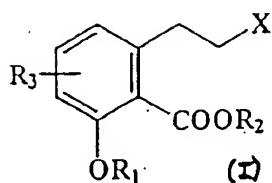
n.d. nicht bestimmt

Resveratrol diente als interne Positivkontrolle in allen Experimenten. Bei einer Konzentration von  $5\mu$ M inhibierte Resveratrol  $52,4 \pm 7,4$  % der DMBA-induzierten präneoplastischen Läsionen.



## PATENTANSPRÜCHE

- 1) Lunularsäurederivat gekennzeichnet durch Formel (I), (II), (III) oder (IV):



worin X einen mono- oder polycyclischen (Hetero)Arylrest bedeutet,

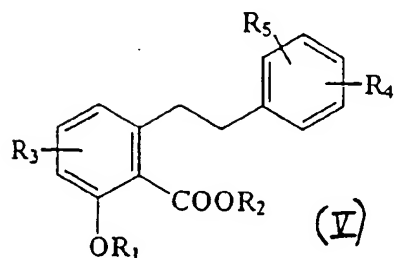
R1 und/oder R2 jeweils unabhängig voneinander einen geraden oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen geraden oder verzweigten Alkenylrest mit 2 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polyzyklischen Alkylrest mit 3 bis 30 Kohlenstoffatomen, einen mono- oder polyzyklischen Alkenylrest mit 4 bis 30 Kohlenstoffatomen, oder einen mono- oder polyzyklischen aromatischen Rest mit 6 bis 30 Kohlenstoffatomen bedeuten,

wobei die Reste X, R1, R2 gegebenenfalls durch einen oder mehrere Substituenten substituiert sein können, wobei diese Substituenten und/oder R3 ausgewählt sind

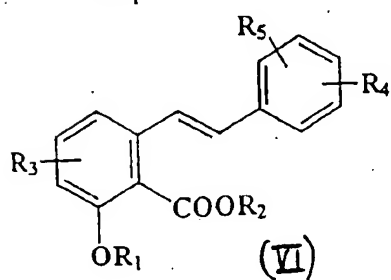
aus:

- Halogen: Fluor, Chlor, Brom, Iod,
- Amino, Alkylamino, Dimethylamino oder Ethylamino, Dialkylamino, wie Dimethylamino, Diethylamino, Methylethylamino, wobei jeder dieser Dialkylaminoreste gegebenenfalls in Oxidform vorliegt,
- Aminoalkyl, wie Aminomethyl oder Aminoethyl,
- Dialkylaminoalkyl, wie Dimethylaminomethyl oder -ethyl,
- Dialkylaminoalkyloxy, wie Dimethylaminoethyloxy,
- Hydroxyl,
- freie, veresterte Carboxylgruppe, wie Alkoxy-carbonyl, beispielsweise Methoxy-carbonyl oder Ethoxy-carbonyl, oder in ein Salz, beispielsweise durch ein Natrium- oder Kaliumatom überführt,
- Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, tert.-Butyl, gegebenenfalls durch ein oder mehrere Halogenatom(e) substituiert, beispielsweise durch Fluor, wie Trifluormethyl,
- Oxo, Cyano, Nitro, Formyl,
- Acyl, wie Acetyl, Propionyl, Butyryl, Benzoyl,
- Acyloxy, wie Acetoxy oder ein Rest der Formel:  
$$-O-CO-(CH_2)_nCO_2H, \text{ worin } n = 1 \text{ bis } 5,$$
- Alkoxy, wie Methoxy, Ethoxy, Propyloxy, Isopropyloxy, Butyloxy,
- Alkylthio, wie Methylthio, Ethylthio, Propylthio, Isopropylthio, Butylthio,
- Carbamoyl,
- Alkenyl, wie Vinyl, Propenyl,
- Alkinyl, wie Ethinyl, Propinyl und
- Aryl, wie Phenyl, Furyl, Thienyl.

- 2) Lunularsäurederivat nach Anspruch 1 gekennzeichnet durch Formel (V) oder (VI):

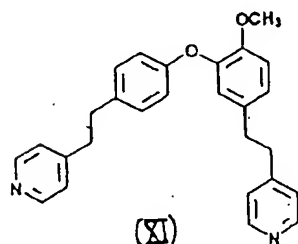
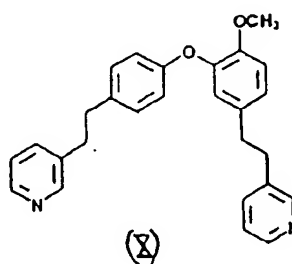
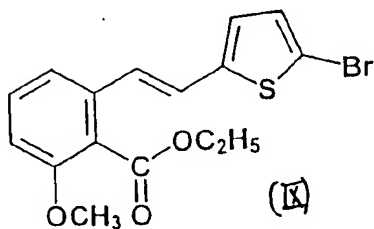
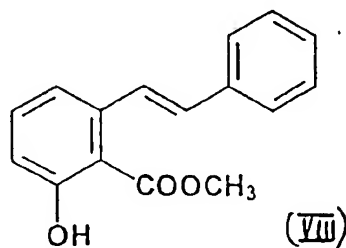
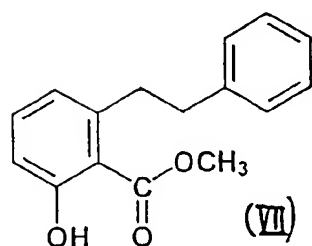


$R_1, R_2 = H, C_2H_5, CH_3$   
 $R_3 - R_5 = H, OH, OR, Br, Cl, AcO$   
 3,4-  
 3,5-  
 2,6



$R_1, R_2 = H, C_2H_5, CH_3$   
 $R_3 - R_5 = H, OH, OR, Br, Cl, AcO$   
 3,4-  
 3,5-  
 2,6

- 3) Lunularsäurederivat nach Anspruch 1 oder 2 mit der Formel (VII), (VIII), (IX), (X) oder (XI):



- 4) Arzneimittel gekennzeichnet durch einen Gehalt an - mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X) oder (XI).
- 5) Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-4, umfassend zusätzlich Vitamine, Mineralstoffe, Antioxidantien, Spurenelemente, Entzündungshemmer, Hormonmodulatoren, Angiogenesehemmer, Modulatoren der Signalübertragung, Proliferationshemmer, Ornithindecarboxylasehemmer, Apoptose-Induktoren, Ballaststoffe und/oder Induktoren von Zellproliferationsprozessen.
- 6) Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-5 bereitgestellt in einer Dosis-Einheits-Form zur Verabreichung an einen Säuger.
- 7) Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1-6 umfassend weiter einen pharmazeutisch verträglichen inerten Träger oder ein Verdünnungsmittel.
- 8) Verwendung eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 1-8 zur Prävention einer Krebserkrankung.
- 9) Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung gemäß Formel (I), (II), (III) oder (IV) mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel vermischt wird.

1/2

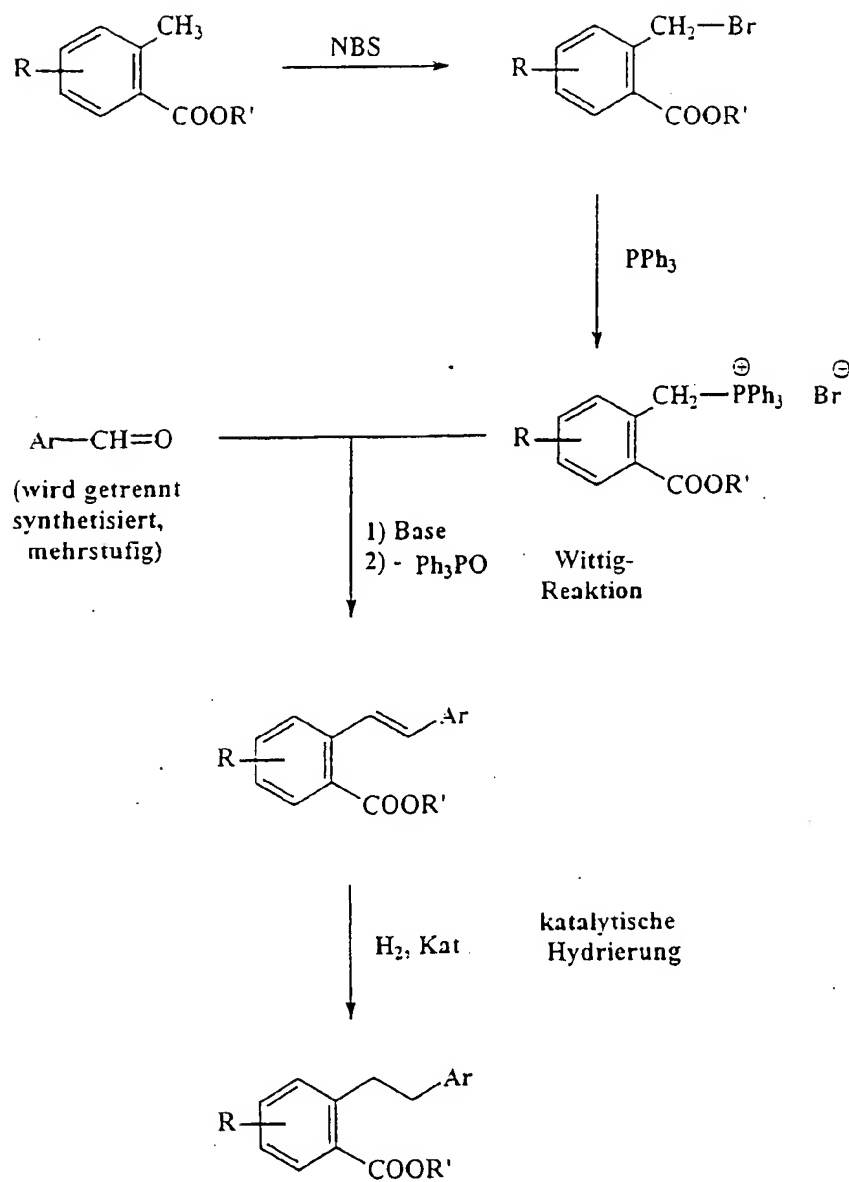
Syntheschema

Fig. 1

2/2

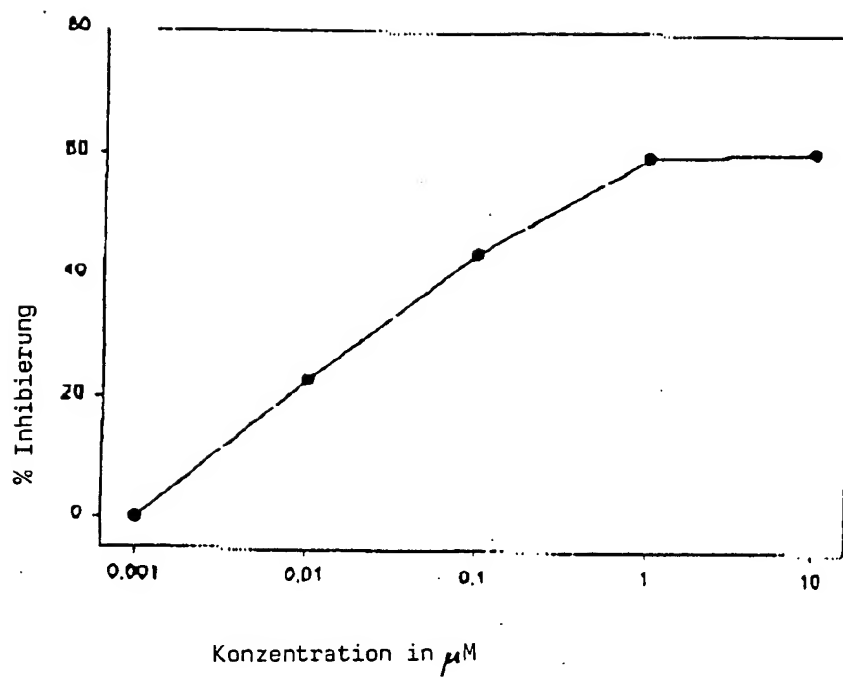


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 01/01264

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C69/94 C07C65/105 C07D333/28 A61K31/235 A61K31/44  
A61K31/381 A61P43/00 C07D213/30 C07D307/54 C07D307/80  
C07D213/55 C07D233/54 C07D213/20 C07D215/14 C07D215/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BEILSTEIN Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 371 062 A (ROLAND ANDREEE) 6 December 1994 (1994-12-06) column 7, line 15 - line 20 column 9, line 23 - line 36 column 15; example 2 --- -/--	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2001

Date of mailing of the international search report

30/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kinzinger, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. .ational Application No

PCT/DE 01/01264

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>					
IPC 7	C07D217/24	C07D213/74	C07D231/16	C07D249/08	C07D239/54
	C07D239/26	C07D213/64	C07D261/10	C07D265/06	C07D311/16
	C07D311/92	C07D317/60	C07D277/32	C07D277/42	C07D333/24
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	<p>UGO AZZENA ET AL.: "Regioselectivity in the Reductive Cleavage of Pyrogallol Derivatives: Reductive Electrophilic Substitution of Acetals of 2,3-Dimethoxyphenol"</p> <p>JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1., 1995, pages 261-266, XP002174711</p> <p>CHEMICAL SOCIETY, LETCHWORTH., GB</p> <p>ISSN: 1472-7781</p> <p>* Verbindungen 27-29 *</p> <p>page 263, right-hand column</p> <p>page 266, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 3</p> <p>---</p> <p>-/--</p>				1,2
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
16 August 2001					
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer  Kinzinger, J		



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. .ational Application No

PCT/DE 01/01264

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NAOKI TAKEUCHI ET AL. : "Annellation Reactions of Enaminones with Ethyl Acetoacetate.Studies on the beta-Carbonyl Compounds Connected with the beta-Polyketides.XI."</p> <p>CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 39, no. 7, July 1991 (1991-07), pages 1655-1658, XP002174712</p> <p>PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP</p> <p>ISSN: 0009-2363</p> <p>* Verbindung 19 *</p> <p>page 1657</p> <p>page 1658, right-hand column, paragraph 3</p>	1,2
X	<p>NAOKI TAKEUCHI ET AL.: "Biogenetic-type Synthesis of 3,4-Dihydro-8-hydroxy-3-phenylisocoumarin (Studies on the beta-Carbonyl Compounds connected with the beta-Polyketides. V )"</p> <p>CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., vol. 28, no. 10, October 1980 (1980-10), pages 3007-3012, XP002174713</p> <p>PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP</p> <p>ISSN: 0009-2363</p> <p>* Verbindungen 9,10,21 *</p> <p>page 3008</p> <p>page 3012, paragraph 3</p>	1,2
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 125, no. 5, 29 July 1996 (1996-07-29)</p> <p>Columbus, Ohio, US;</p> <p>abstract no. 51414v,</p> <p>NAKAYAMA TAKATO ET AL.: "Inhibiting effects of lunularic acid analogs on the growth of liverwort,watercress, and timothy grass"</p> <p>page 403; column r;</p> <p>XP002174714</p> <p>abstract</p> <p>&amp; BIOSCI.,BIOTECHNOL.,BIOCHEM., vol. 60, no. 5, 1996, pages 862-865,</p> <p>* 2-methoxy-6-styryl-benzoesäure und äthylester,2-methoxy-6-phenäthyl-benzoesäure äthylester</p>	1
A	<p>EP 0 539 326 A (SANDOZ LTD)</p> <p>28 April 1993 (1993-04-28)</p> <p>the whole document</p>	4

## INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

Claims Nos.: 1-9 (partially )

Present patent claims 1 to 9 relate to a disproportionately large number of possible compounds. They relate to such a large number of possible choices, variables, possible permutations and/or restrictions that they lack clarity (and/or conciseness) according to the terms of Article 6 PCT to such an extent that a meaningful search seems impossible. Also, the clarity of claim 1 seems doubtful as it does not include the possibility of R1 and R2 = H (hydrogen) although this possibility is expressly mentioned in the description and in claims 2 and 3. The search yielded in the initial phase a very large number of novelty-destroying documents. These documents are so numerous that it is impossible to establish for what subject matter protection could be justifiably sought for the totality of the claims. Therefore, the search was directed to those parts of the claims that are considered clear (and/or concise), namely to the compounds of formulae VII, VIII and IX as they are indicated in the working examples. The other compounds encompassed by the claims are further not supported by corresponding examples in the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. .ational Application No

PCT/DE 01/01264

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5371062 A	06-12-1994	DE 4211610 A BR 9301464 A CA 2093291 A EP 0564920 A JP 6049040 A	14-10-1993 13-10-1993 08-10-1993 13-10-1993 22-02-1994
EP 539326 A	28-04-1993	AT 136536 T AU 653441 B AU 2704492 A CA 2080555 A CZ 282473 B DE 69209771 D DK 539326 T ES 2087499 T FI 924657 A GR 3019856 T HK 146696 A HU 215151 B HU 211233 B IL 103417 A JP 2543298 B JP 5213828 A MX 9205921 A NO 178540 B NZ 244730 A RO 111074 B RU 2118311 C SG 50542 A SK 312592 A US 5488135 A ZA 9208021 A	15-04-1996 29-09-1994 22-04-1993 17-04-1993 16-07-1997 15-05-1996 20-05-1996 16-07-1996 17-04-1993 31-08-1996 09-08-1996 28-12-1998 28-11-1995 10-01-1997 16-10-1996 24-08-1993 01-04-1993 08-01-1996 26-10-1994 28-06-1996 27-08-1998 23-05-2000 08-03-1995 30-01-1996 18-04-1994

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01264

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C07C69/94 C07C65/105 C07D333/28 A61K31/235 A61K31/44 A61K31/381 A61P43/00 C07D213/30 C07D307/54 C07D307/80 C07D213/55 C07D233/54 C07D213/20 C07D215/14 C07D215/10		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07C C07D A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) BEILSTEIN Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 371 062 A (ROLAND ANDREEE) 6. Dezember 1994 (1994-12-06) Spalte 7, Zeile 15 - Zeile 20 Spalte 9, Zeile 23 - Zeile 36 Spalte 15; Beispiel 2 --- -/--	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
16. August 2001		30/08/2001
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Kinzinger, J

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01264

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07D217/24 C07D213/74 C07D231/16 C07D249/08 C07D239/54  
C07D239/26 C07D213/64 C07D261/10 C07D265/06 C07D311/16  
C07D311/92 C07D317/60 C07D277/32 C07D277/42 C07D333/24

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>UGO AZZENA ET AL.: "Regioselectivity in the Reductive Cleavage of Pyrogallol Derivatives: Reductive Electrophilic Substitution of Acetals of 2,3-Dimethoxyphenol"</p> <p>JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1., 1995, Seiten 261-266, XP002174711</p> <p>CHEMICAL SOCIETY, LETCHWORTH., GB</p> <p>ISSN: 1472-7781</p> <p>* Verbindungen 27-29 *</p> <p>Seite 263, rechte Spalte</p> <p>Seite 266, linke Spalte, Absatz 2 - Absatz 3</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2

<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		<p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>	
<p>Datum des Abschlusses der internationalen Recherche</p> <p>16. August 2001</p>		<p>Absenddatum des internationalen Recherchenberichts</p>	
<p>Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde</p> <p>Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Bevollmächtigter Bediensteter</p> <p>Kinzinger, J</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01264

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>NAOKI TAKEUCHI ET AL. : "Annellation Reactions of Enaminones with Ethyl Acetoacetate.Studies on the beta-Carbonyl Compounds Connected with the beta-Polyketides.XI."</p> <p>CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 39, Nr. 7, Juli 1991 (1991-07), Seiten 1655-1658, XP002174712</p> <p>PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP</p> <p>ISSN: 0009-2363</p> <p>* Verbindung 19 *</p> <p>Seite 1657</p> <p>Seite 1658, rechte Spalte, Absatz 3</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>NAOKI TAKEUCHI ET AL.: "Biogenetic-type Synthesis of 3,4-Dihydro-8-hydroxy-3-phenylisocoumarin (Studies on the beta-Carbonyl Compounds connected with the beta-Polyketides. V ) "</p> <p>CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN., Bd. 28, Nr. 10, Oktober 1980 (1980-10), Seiten 3007-3012, XP002174713</p> <p>PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN. TOKYO., JP</p> <p>ISSN: 0009-2363</p> <p>* Verbindungen 9,10,21 *</p> <p>Seite 3008</p> <p>Seite 3012, Absatz 3</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 125, no. 5, 29. Juli 1996 (1996-07-29)</p> <p>Columbus, Ohio, US;</p> <p>abstract no. 51414v,</p> <p>NAKAYAMA TAKATO ET AL.: "Inhibiting effects of lunularic acid analogs on the growth of liverwort,watercress, and timothy grass"</p> <p>Seite 403; Spalte r;</p> <p>XP002174714</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>&amp; BIOSCI.,BIOTECHNOL.,BIOCHEM., Bd. 60, Nr. 5, 1996, Seiten 862-865,</p> <p>* 2-methoxy-6-styryl-benzoesäure und äthylester,2-methoxy-6-phenäthyl-benzoesäure äthylester</p> <p>---</p>	1
A	<p>EP 0 539 326 A (SANDOZ LTD)</p> <p>28. April 1993 (1993-04-28)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	4

## WEITERE ANGABEN

PCT/SA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-9 teilweise

Die geltenden Patentansprüche 1-9 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen. In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten, Veränderliche, mögliche Permutationen und/oder Einschränkungen, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar (und/oder zu weitläufig gefasst) erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Ausserdem ist die Klarheit von Anspruch 1 zweifelhaft, da dieser die Möglichkeit von R1 und R2 = H (Wasserstoff) nicht einschliesst obwohl in der Beschreibung und den Ansprüchen 2 und 3 diese Möglichkeit ausdrücklich beschrieben ist. Die Recherche ergab in der Anfangsphase eine sehr grosse Zahl neuheitsschädlicher Dokumente. Diese Zahl ist so gross, dass sich unmöglich feststellen lässt, für was in der Gesamtheit der Patentansprüche eventuell nach zu Recht Schutz begehrt werden könnte. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar (und/oder knapp gefasst) gelten können, nämlich Verbindungen der Formel VII, VIII und IX wie diese in den Ausführungsbeispielen angegeben sind. Die anderen durch die Patentansprüche erfassten Verbindungen sind ausserdem nicht durch entsprechende Beispiele in der Beschreibung unterstützt.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In. .ationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01264

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5371062 A	06-12-1994	DE 4211610 A	14-10-1993
		BR 9301464 A	13-10-1993
		CA 2093291 A	08-10-1993
		EP 0564920 A	13-10-1993
		JP 6049040 A	22-02-1994
EP 539326 A	28-04-1993	AT 136536 T	15-04-1996
		AU 653441 B	29-09-1994
		AU 2704492 A	22-04-1993
		CA 2080555 A	17-04-1993
		CZ 282473 B	16-07-1997
		DE 69209771 D	15-05-1996
		DK 539326 T	20-05-1996
		ES 2087499 T	16-07-1996
		FI 924657 A	17-04-1993
		GR 3019856 T	31-08-1996
		HK 146696 A	09-08-1996
		HU 215151 B	28-12-1998
		HU 211233 B	28-11-1995
		IL 103417 A	10-01-1997
		JP 2543298 B	16-10-1996
		JP 5213828 A	24-08-1993
		MX 9205921 A	01-04-1993
		NO 178540 B	08-01-1996
		NZ 244730 A	26-10-1994
		RO 111074 B	28-06-1996
		RU 2118311 C	27-08-1998
		SG 50542 A	23-05-2000
		SK 312592 A	08-03-1995
		US 5488135 A	30-01-1996
		ZA 9208021 A	18-04-1994